

THÈSE

PRÉSENTÉE

DEVANT L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD
DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Marie-Jeanne VACHERON

ETUDE STRUCTURALE DES CONSTITUANTS DE LA PAROI CELLULAIRE DE *NOCARDIA KIROVANI* LIPIDES ET PEPTIDOGLYCANE

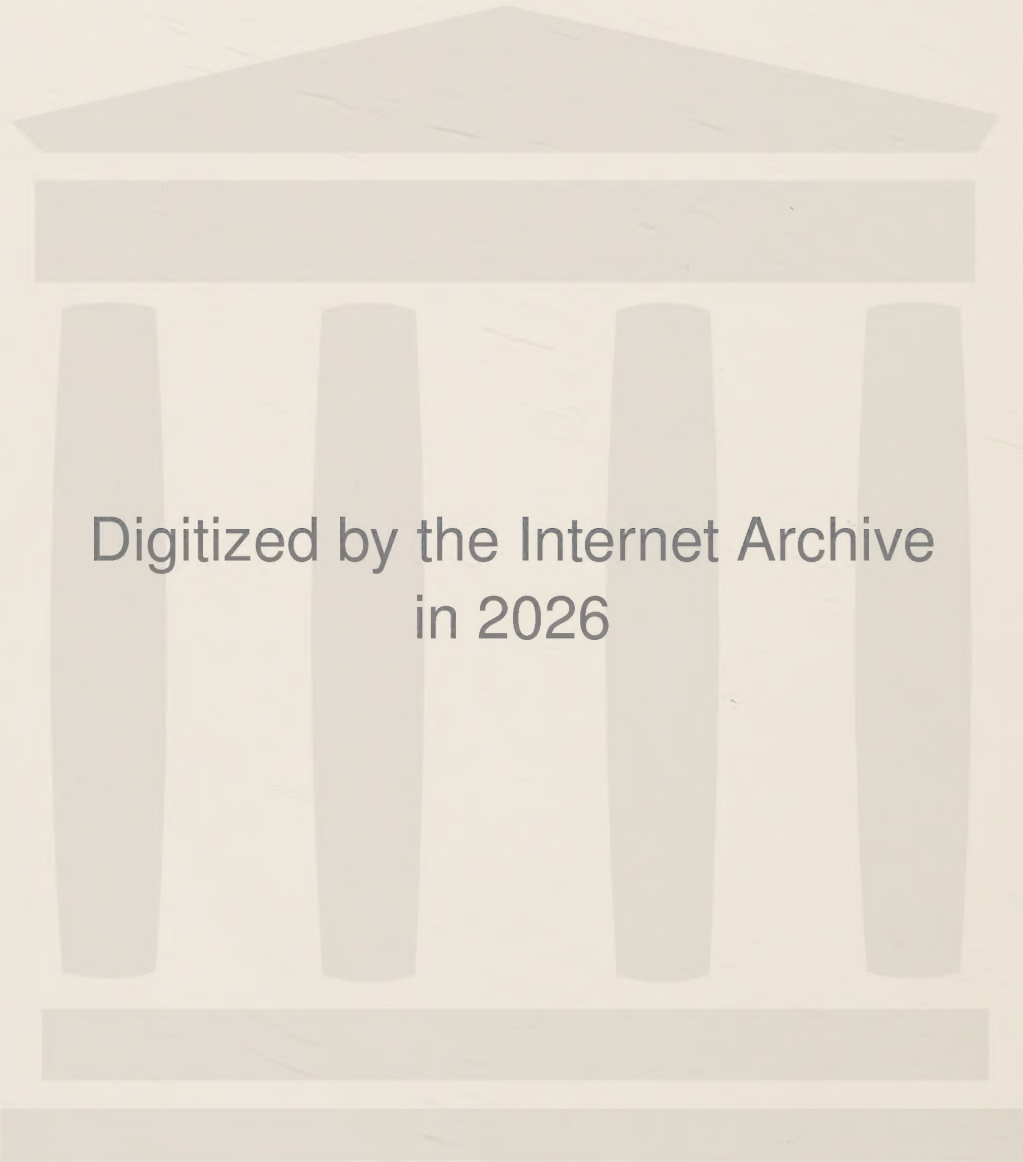
Soutenue le 16 Septembre 1971 devant la Commission d'Examen :

MM. J. CHOPIN *Président*

G. MICHEL
J.-F. PETIT

} *Examineurs*

LYON
1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552625_0005

THÈSE

PRÉSENTÉE

DEVANT L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD
DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Marie-Jeanne VACHERON

ETUDE STRUCTURALE DES CONSTITUANTS DE LA PAROI CELLULAIRE DE *NOCARDIA KIROVANI* LIPIDES ET PEPTIDOGLYCANE

Soutenue le 16 Septembre 1971 devant la Commission d'Examen :

MM. J. CHOPIN *Président*

G. MICHEL
J.-F. PETIT } *Examineurs*

LYON

1971



UNIVERSITE CLAUDE BERNARD

LYON

Président : M. le Professeur J. BOIDIN.

1er Vice-Président : M. R. TOURAINÉ, Maître de Conférences agrégé.

2ème Vice-Président : M. P. PONCET, Maître-Assistant.

3ème Vice-Président : M. D. SETTELEN, Etudiant.

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

UNITES

DIRECTEURS

U.E.R. médicale Grange-Blanche	M.le Professeur D. GERMAIN
U.E.R. médicale Alexis-Carrel	M.le Professeur C. GIROD
U.E.R. médicale LYON-Nord	M.le Professeur A. BERTOYE
U.E.R. médicale LYON-Sud-Ouest	M.le Professeur L. TOLOT
U.E.R. des Sciences pharmaceutiques	M. M. CARRAZ, Maître de Conférences agrégé
U.E.R. des Techniques de Réadaptation	M.le Professeur P. MOUNIER-KÜHN
U.E.R. de Biologie Humaine	M. J. C. CZYBA, Maître de Conférences agrégé
Institut Régional d'Education Physique et Sportive	M. J. SAPIN, Professeur E. P. S.
U.E.R. de Mathématiques	M.le Doyen J. BRACONNIER
U.E.R. de Physique	M.le Professeur M. DUFAY
U.E.R. de Chimie et Biochimie	M.le Professeur D. GAUTHERON
U.E.R. des Sciences de la Nature	M.le Professeur L. DAVID
U.E.R. de Biodynamique et Psychopédagogie	M.le Professeur J. CHANEL
U.E.R. de Physique nucléaire	M.le Professeur A. SARAZIN
Institut Universitaire de Technologie I	M.le Professeur L. FEUVRAIS
Institut Universitaire de Technologie II	M. J. GALLET
Observatoire	M.le Professeur J. H. BIGAY
<u>Secrétaire Général</u> : M. P. IZAUTE	

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université de Lyon, sous la direction de Monsieur le Professeur G. MICHEL. Je suis heureuse de lui exprimer ma profonde reconnaissance pour l'intérêt constant avec lequel il a dirigé mes travaux et les encouragements qu'il m'a toujours prodigués.

Je remercie Monsieur le Professeur J. CHOPIN d'avoir bien voulu présider le jury.

Je remercie Monsieur J.F. PETIT, Maître de Recherches au C.N.R.S. d'avoir accepté de faire partie de ce jury, et de m'avoir accueillie quelques jours dans son Laboratoire.

Je remercie Monsieur J.M. GHUYSEN, Professeur à l'Université de Liège (Belgique) pour ses précieux conseils. Il nous a aimablement donné les enzymes indispensables à l'étude des parois.

Mes remerciements vont également à Madame M. LEYH-BOUILLE de l'Université de Liège qui a effectué certaines réactions enzymatiques.

Il m'est agréable de remercier Mademoiselle M. GUINAND, Chargée de Recherches au C.N.R.S. qui m'a initiée à la recherche et m'a apporté son aide amicale au cours de ce travail.

INTRODUCTION

La cellule bactérienne est entourée d'une coque protectrice, la paroi, qui donne la forme et la rigidité à la bactérie et lui permet de résister au milieu extérieur.

L'étude de la paroi cellulaire a fait l'objet de nombreux travaux résumés dans différents ouvrages et revues (1-7).

Chez les bactéries Gram positives la paroi, examinée au microscope électronique, apparaît comme une structure définie, amorphe, d'épaisseur constante variant de 15 à 80 nm, la membrane cytoplasmique recouvre la surface interne de la paroi ; chez les bactéries Gram négatives la paroi cellulaire et la membrane sont au contraire étroitement associées.

La paroi cellulaire est constituée de plusieurs hétéropolymères : peptidoglycane, acides teichoïques, polysaccharides, protéines chez les bactéries Gram positives ; peptidoglycane, lipopolysaccharides, lipoprotéines chez les bactéries Gram négatives. Ces derniers polymères, polysaccharides et protéines sont responsables des propriétés biologiques spécifiques des bactéries.

Le peptidoglycane appelé encore muréine ou mucopeptide est le composé macromoléculaire commun à toutes les bactéries, seules les bactéries halophiles en sont dépourvues (8)(9), il est responsable de la rigidité de la paroi. Il représente 5 à 10 % seulement de l'enveloppe cellulaire des bactéries Gram négatives (1)(2) et une plus grande proportion de la paroi des bactéries Gram positives, jusqu'à 80 à 90 % chez Micrococcus lysodeikticus (2).

L'étude du peptidoglycane a montré qu'il était formé d'un nombre restreint de composés : deux sucres acétamidés la N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylmuramique (3-O-lactyl-N-acétyl-D-glucosamine), des acides aminés : l'alanine, l'acide glutamique et un acide diaminé qui est généralement l'acide diaminopimélique (DAP) ou la lysine, exceptionnellement l'acide 2,4-diaminobutyrique, l'acide 2,6-diamino-3-hydroxypimélique, l'ornithine ou l'hydroxylysine. Quelques espèces bactériennes renferment également d'autres acides aminés supplémentaires comme le glycocolle, l'acide aspartique, la sérine ou la thréonine. L'acide muramique et le DAP sont des constituants spécifiques de la paroi cellulaire.

Certains acides aminés ont la configuration D. L'alanine existe sous les deux formes D et L dans un rapport voisin de 1:1, l'acide glutamique possède toujours la configuration D (10), la lysine est généralement présente sous la forme L (11), quant au DAP, il peut exister sous les trois formes LL, DD ou meso (DL). Une même espèce bactérienne peut renfermer deux isomères, LL et meso (12) ou DD et meso (13)(14).

Le peptidoglycane est construit suivant un modèle bien déterminé. L'isolement et la caractérisation d'enzymes bactériolytiques par Ghuysen (6) a permis de dégrader spécifiquement ce polymère insoluble en fragments solubles et d'élucider ainsi sa structure. Il est formé de chaînes linéaires polysaccharidiques comprenant les deux hexosamines, N-acétyl-D-glucosamine et acide N-acétylmuramique, régulièrement alternées ; les deux sucres sous la forme pyranosique sont reliés par des liaisons $\beta 1 \rightarrow 4$. L'acide N-acétylmuramique peut avoir un acétate supplémentaire (15)(16)(17). Récemment l'acide N-glycolylmuramique a été trouvé, remplaçant l'acide N-acétylmuramique dans le peptidoglycane de Mycobacterium smegmatis (18). Cette structure semble spécifique de certaines espèces bactériennes : Mycobactéries (19) et vraisemblablement Micromonospora (20). Des chaînes peptidiques formées de sous-unités tétrapeptidiques sont fixées par une liaison amide au carboxyle du résidu lactique de l'acide muramique. Ces tétrapeptides ont la structure générale : $(\text{NH}_2)\text{-L Ala-}\delta\text{-D Glu-}\textit{meso}\text{-DAP}$ (ou Lys)-D Ala-(COOH). Cependant la L alanine est remplacée par la L sérine chez Butyribacterium rettgeri (21) (22) ou par le glycolle chez Corynebacterium poinsettiae (23), C. flaccumfaciens, C. betae (6) et Microbacterium lactinum (24). L'acide glutamique peut être remplacé par l'acide thréo-3-hydroxyglutamique (25) ou encore amidé sur le carboxyle chez Staphylococcus aureus, Micrococcus roseus, Streptococcus pyogenes (26), Arthobacter crystallopoietes (27). La structure isoglutamine a été également trouvée chez Staphylococcus epidermidis (28), Streptococcus faecalis (29), Corynebacterium diphtheriae (30), Lactobacillus casei (31) et chez différentes souches de mycobactéries (32) ; l'acide glutamique est substitué par un résidu glycyl chez Micrococcus lysodeikticus (27)(33)(34). De même le carboxyle du DAP non engagé dans la liaison peptidique est amidifié chez C. diphtheriae (30), Bacillus subtilis (35) et chez les mycobactéries (32). L'acide diaminé Lys ou DAP peut être remplacé par la L ornithine, l'acide 2,4-diaminobutyrique, l'acide 2,6-diamino-3-hydroxypimélique ou plus rarement par un acide monoaminé, l'homosérine.

Malgré ces quelques différences il faut remarquer que chez toutes les bactéries, l'enchaînement des aminoacides des tétrapeptides obéit à une même stéréochimie. Le premier acide aminé possède la configuration L ou bien c'est le glycolle, le deuxième acide aminé est sous la forme D (D Glu), son -COOH en δ est lié au -NH₂ du troisième aminoacide qui est généralement diaminé (Lys ou DAP). Cet acide aminé est de configuration L, dans le cas du DAP le NH₂ engagé dans la liaison peptidique est situé

sur le carbone L. Enfin le quatrième acide aminé est toujours D Ala. L'alternance L-D-L-D est un caractère commun à l'unité peptidique du peptidoglycane de toutes les bactéries.

Les tétrapeptides sont reliés entre eux par des ponts interpeptidiques qui s'étendent du -COOH de la D alanine terminale au -NH₂ de l'acide diaminé d'une unité peptidique voisine. Les liaisons peuvent se faire directement entre ces deux acides aminés, ou par l'intermédiaire d'un autre acide aminé ou d'un peptide et présentent de grandes variations. En se basant sur les différentes liaisons interpeptidiques et sur la nature de l'acide diaminé Ghuyssen classe les peptidoglycans bactériens en 4 types (6).

Dans le type I la liaison de "cross-linkage" se fait directement entre le carboxyle de la D alanine C-terminale d'une unité peptidique et le -NH₂ du carbone D du meso DAP d'une unité peptidique adjacente, ce qui donne le schéma représenté à la figure 1.

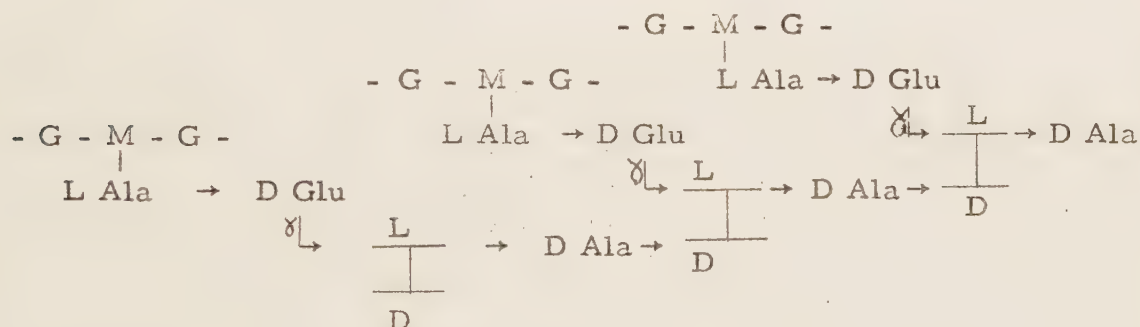
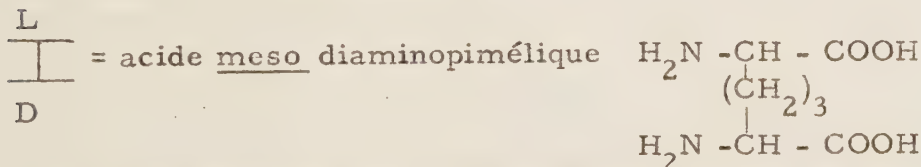


Figure I

Représentation d'une portion du peptidoglycane du type I.

G = N-acétylglucosamine

M = acide N-acétylmuramique



L et D représentent les configurations optiques des carbones asymétriques.

Escherichia coli (4), Bacillus megaterium (13)(14), Bacillus subtilis (35) sont les principaux représentants de ce type de peptidoglycane.

Dans le type II, la liaison entre les 2 unités peptidiques se fait par l'intermédiaire d'un acide aminé ou d'un peptide. Les principaux ponts interpeptidiques étudiés sont les suivants (6) :

- L alanine chez A. crystallopoietes
- D isoasparagine chez S. faecalis, Lactobacillus acidophilus, L. casei.
- glycine chez Clostridium perfringens, Streptomyces Sp (36).
- L Ala-L Ala chez S. pyogenes.
- tri-L Ala chez M. roseus Thr (-)
- tri-L Ala-L Thr chez M. roseus R 27
- penta-Gly chez S. aureus Copenhagen

Le peptidoglycane type III qui se rapproche de celui du type II a été trouvé principalement chez quelques espèces de Micrococcus. Le pont est constitué de un ou plusieurs peptides ayant la même séquence d'acides aminés que l'unité peptidique. Ainsi chez M. lysodeikticus 4 pentapeptides qui ont pour structure L Ala- δ -D Glu- α (Gly)-L Lys- D Ala relient 2 unités peptidiques de structure identique.

Enfin le pontage du peptidoglycane du type IV est effectué par l'intermédiaire d'un acide diaminé, l'acide D diaminobutyrique (37), la D ornithine ou la D lysine (38)(22), ou par un peptide tel que N α -glycyl-L lysine (39). Ce pont s'étend du carboxyle de l'acide glutamique d'une unité peptidique à l'alanine C-terminale d'une autre unité peptidique. Les bactéries qui ne renferment pas d'acide diaminé dans l'unité peptidique ont ce type de peptidoglycane (C. poinsettiae, C. flaccumfaciens, C. betae).

Ainsi le peptidoglycane bactérien formé de chaînes linéaires de sucres auxquelles sont liés des tétrapeptides eux-mêmes reliés entre eux par des ponts interpeptidiques constitue un réseau tridimensionnel. La densité de ce réseau varie d'une espèce à l'autre. Chez M. lysodeikticus le réseau est très lâche, en effet 40 % seulement des résidus d'acide N-acétylmuramique sont substitués par des peptides (40)(41), ces peptides sont "cross-linkés" par des ponts interpeptidiques formés de pentapeptides ; dans les parois natives la majorité des peptides se trouvent sous forme d'hexamères, c'est-à-dire que deux unités peptidiques sont reliées par 4 pentapeptides. Les mailles du réseau ainsi formé sont donc peu serrées si nous les comparons à celles du peptidoglycane de S. aureus où tous les résidus d'acide N-acétylmuramique sont substitués par des unités tétrapeptidiques et où une proportion élevée de ces unités est "cross-linkée" par l'intermédiaire de ponts pentaglycine (42).

Une représentation schématique de deux chaînes polyhexosaminidiques substituées par des unités peptidiques dont deux d'entre elles sont "cross-linkées" est donnée à la figure 2.

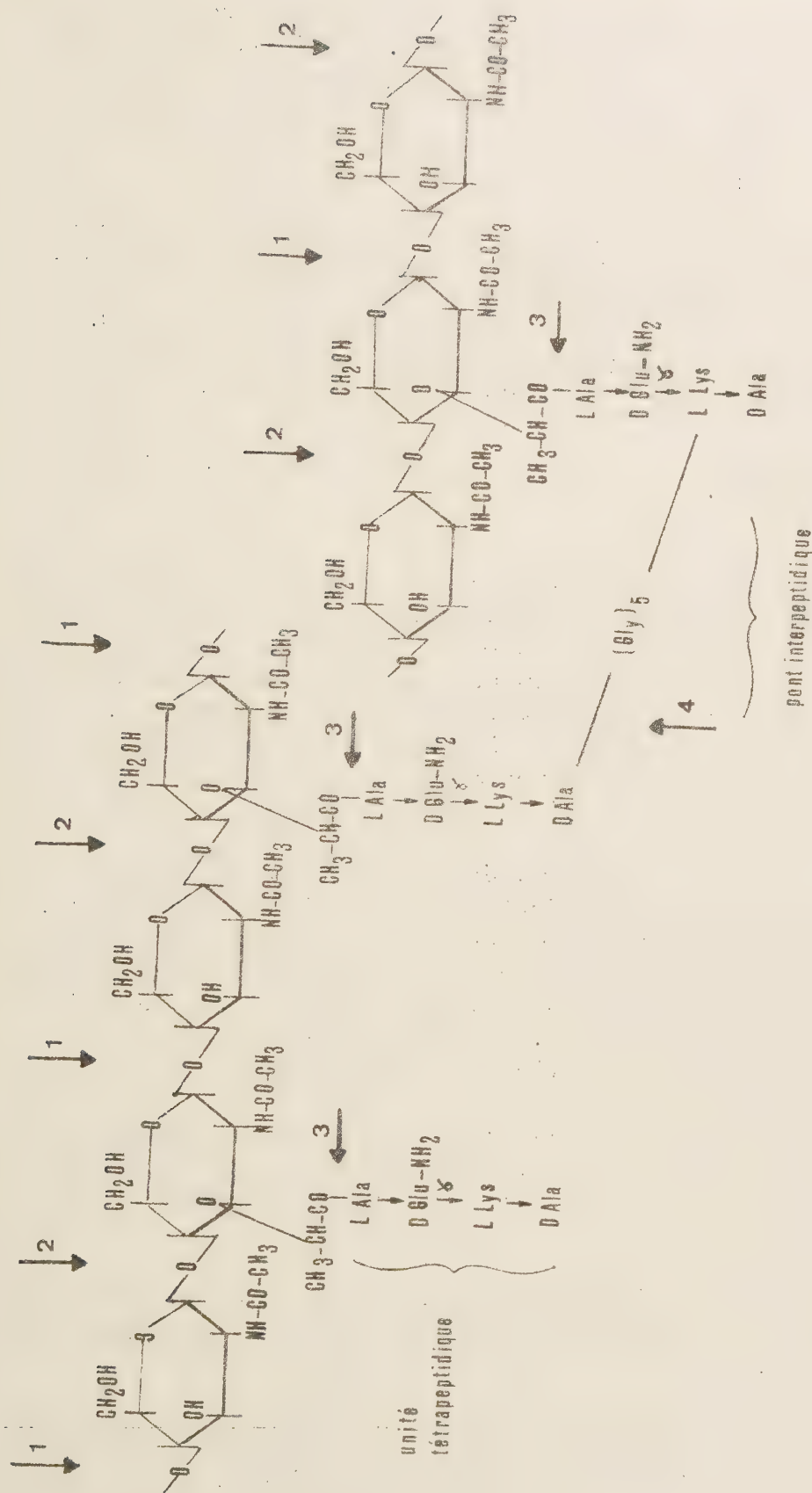


Figure 2. Représentation schématique d'un fragment de peptidoglycane de la paroi de *S. aureus*.

1. Sites d'action d'une endo-N-acétylmuramidase
2. " " " endo-N-acétylglucosaminidase
3. " " " de la N-acétylmuramyl-L-alanine amidase
4. " " " d'une endopeptidase.

L'étude structurale du peptidoglycane exige tout d'abord sa solubilisation et sa dégradation par différentes enzymes. Depuis quelques années de nombreuses enzymes actives sur les parois et sécrétées par les bactéries ont été purifiées ; une revue récente de Ghuyssen (6) indique l'utilisation de ces enzymes lors de l'étude des peptidoglycanes. Suivant la liaison qu'elles coupent nous distinguons :

- les endo-N-acétylmuramidases qui coupent la liaison osidique entre l'acide N-acétylmuramique et la N-acétylglucosamine (liaison 1 figure 2).
- les endo-N-acétylglucosaminidases qui coupent la liaison entre la N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylmuramique (liaison 2 figure 2).
- la N-acétylmuramyl-L-alanine amidase active sur la liaison amide entre le carboxyle de l'acide muramique et le groupement aminé de la L alanine (liaison 3 figure 2).
- les endo-peptidases susceptibles de scinder les liaisons interpeptidiques (liaison 4 figure 2).

L'étude structurale complète des parois des *Nocardia* n'avait jamais été réalisée. Les acides du peptidoglycane, Ala, Glu, DAP avaient été trouvés dans les parois brutes (43)(44) mais les recherches effectuées jusqu'à présent consistaient essentiellement en une analyse comparée des acides aminés et des sucres de différents Actinomycètes (45)(46)(47). Rappelons que les *Nocardia* appartiennent à la famille des Actinomycetaceae, dans l'ordre des Actinomycétales (48) ; en raison de leur place dans la classification bactérienne elles ont une parenté phylogénique avec les mycobactéries.

L'analyse des parois des mycobactéries a montré qu'elles sont constituées principalement d'un glycolipide et d'un peptidoglycane (49-55). Ainsi ces parois semblent différentes de celles des autres bactéries Gram positives, elles ne renferment pas d'acides teichoïques et les lipides généralement absents chez les bactéries Gram positives existent en proportion importante chez les mycobactéries (1). Parmi ces lipides, les acides mycoliques ont été identifiés, ils estérifient un arabinogalactane (51)(52) (53).

La mise en évidence d'acides nocardiques de nature mycolique chez différents *Nocardia* (56)(57)(58) et la forte teneur en lipides de ces bactéries (59) laissaient donc supposer pour les parois une structure rappelant celle des mycobactéries.

Nous avons donc effectué l'étude structurale des parois d'un *Nocardia* : *Nocardia kirovani* *, en envisageant successivement l'étude des lipides puis celle du peptidoglycane.

* Cette souche provient de l'Institut Mérieux, Marcy l'Etoile.

Bien que le pourcentage lipidique dans les parois soit élevé, il était difficile de préparer ces parois en quantité suffisante pour une étude complète des lipides. Nous avons utilisé les lipides totaux et nous avons vérifié ensuite leur présence dans les parois. La première partie du travail porte sur l'analyse des lipides de Nocardia kirovani avec la démonstration des structures d'un caroténoïde qui donne au bacille sa coloration rose, des composés à haut poids moléculaire : acides nocardiques, nocardols, nocardones et de deux séries de triglycérides. Nous avons observé ensuite l'évolution de la composition lipidique au cours de la croissance chez les Nocardia.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons étudié le peptidoglycane isolé de la paroi de Nocardia kirovani. Nous avons déterminé sa structure par l'isolement et l'identification des produits résultant d'hydrolyses par les enzymes spécifiques.

PREMIERE PARTIE

ETUDE DES LIPIDES

ETUDE DU CAROTENOÏDE *

De nombreuses espèces de *Nocardia* présentent une coloration allant du jaune clair au rouge brun, mais peu d'études ont été faites pour déterminer la nature de leurs pigments. O.R. Brown et J.B. Clark (60) ont isolé de *Nocardia corallina* un mélange pigmentaire qui renferme de l'azote. Après fractionnement du mélange par chromatographie, J.L. Stees et coll. (61) attribuent au constituant principal une structure semblable à celle du chromophore des actinomycines.

Les pigments de *Actinomadura* (*Nocardia*) *pelletieri* et *Actinomadura madurae* ont été étudiés par M.N. Gerber (62)(63) : plusieurs composés ont été séparés et une structure dérivée de la prodigiosine leur a été attribuée.

Des pigments caroténoïdiques ont été isolés à partir d'une souche de *Nocardia asteroides* (*Proactinomyces asteroides*) par G.I. El-Registan et coll. (64), ils ont été identifiés au β -carotène, δ -carotène, tétrahydrolycopène et prolycopène.

Dans les mycobactéries, deux glucosides de caroténoïdes ont été isolés et caractérisés : S. Hertzberg et S. Liaaen-Jensen (65) ont identifié la phlei-xanthophylle et la 4-céto-phlei-xanthophylle dans *Mycobacterium phlei* souche Vera.

La souche de *Nocardia kirovani* que nous avons étudiée possède une coloration rouge particulièrement intense (66); les pigments sont extraits du mycelium après culture d'une semaine sur milieu de Sauton. La fraction lipidique obtenue par traitement à l'alcool-éther (1:1) donne par chromatographie sur colonne de nombreux composés mineurs colorés. La pigmentation résiduelle des bacilles est extraite par le chloroforme. Par chromatographie sur couches minces de gel de silice, on isole un composé principal rouge-orangé de $R_f = 0,25$ dans le solvant chloroforme-méthanol (19:1). Son spectre visible enregistré dans l'acétone (figure 3) présente un profil caractéristique des caroténoïdes, avec un pic médian intense à 478 nm et deux autres pics plus faibles à 455 et 508 nm.

* Je remercie Monsieur N. Arpin, laboratoire de Biologie Végétale de l'Université de Lyon I pour ses précieux conseils.

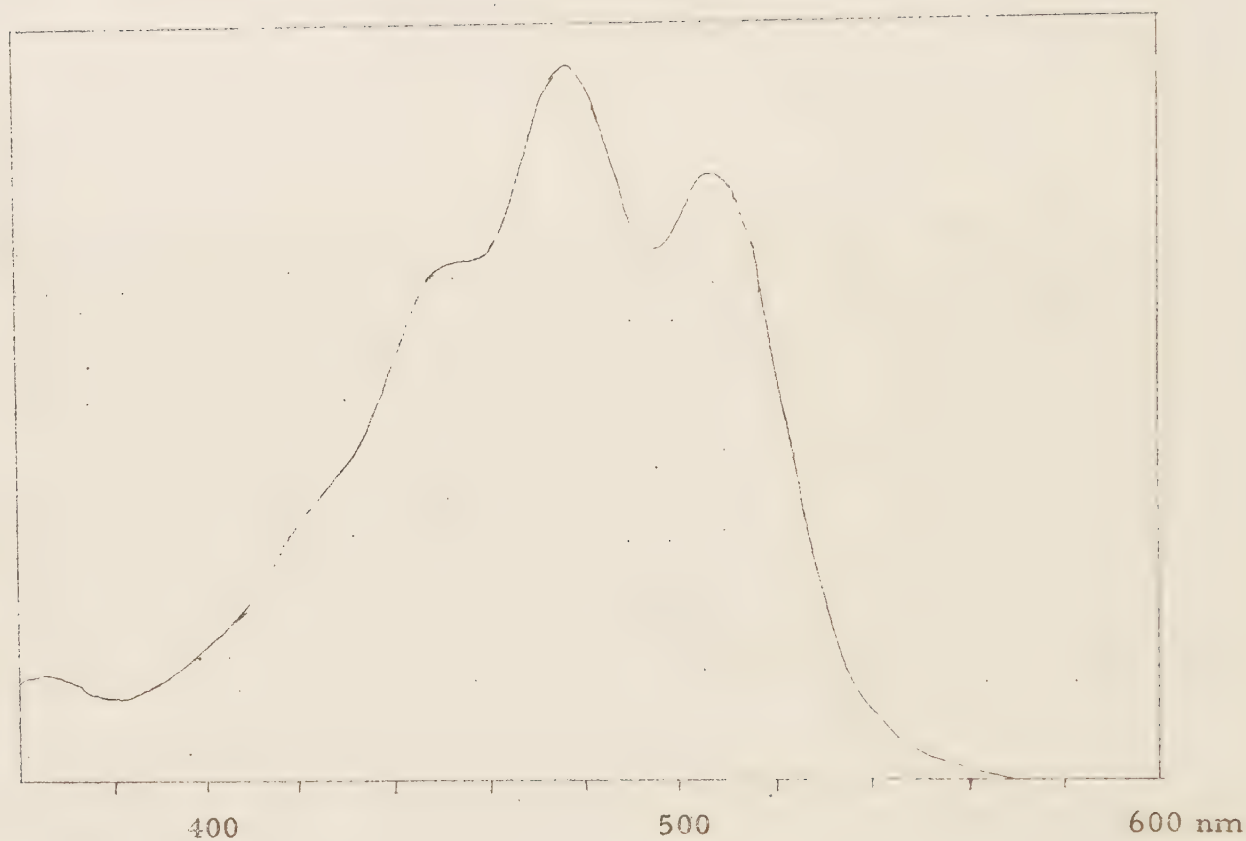


Figure 3.

Spectre d'absorption du caroténoïde isolé de Nocardia kirovani (solution acétonique).

Depuis les travaux de Kuhn (67) et de Karrer et Jucker (68) on connaît la relation entre la longueur d'onde du maximum d'absorption principal et le nombre de doubles liaisons conjuguées dans le système polyénique. Ainsi par comparaison avec les longueurs d'ondes des composés de référence (tableau I) la valeur de λ_{max} permet de connaître le nombre de doubles liaisons conjuguées qui constituent le chromophore.

TABLEAU I

Influence du nombre de doubles liaisons conjuguées sur la longueur d'onde du maximum d'absorption

<u>Composé</u>	<u>Nombre de doubles liaisons conjuguées</u>	<u>$\lambda_{\text{max.}}$ (nm)</u> <u>(éther de pétrole)</u>	<u>Référence</u>
Neurosporène	9	440	69
Lycopène	11	472	69
Déhydro-3, 4-lycopène	13	494	70

D'après ces données, le caroténoïde isolé de N. kirovani possède 11 doubles liaisons conjuguées dans sa chaîne linéaire. La différence de $\lambda_{\text{max.}}$ observée avec celle du lycopène à 11 doubles liaisons provient vraisemblablement de la nature de l'extrémité de la chaîne polyénique qui doit comporter un cycle insaturé. On sait en effet qu'une double liaison conjuguée possède un effet bathochrome plus faible lorsqu'elle est située dans un cycle que lorsqu'elle appartient à une chaîne acyclique (71). A cette diminution du déplacement de $\lambda_{\text{max.}}$ s'ajoute également une diminution de la structure fine du spectre.

Par chromatographie circulaire sur papier imprégné de Kieselguhr (Schleicher et Schüll n° 287) (72), le pigment isolé de Nocardia kirovani se comporte comme un composé fortement polaire : $R_f = 0,60$ dans le solvant benzène-acétone (70:30).

L'acétylation montre qu'il s'agit d'une xanthophylle fortement hydroxylée. Il est possible de préciser le nombre de groupements hydroxyles libres par une étude de la cinétique de l'acétylation. Celle-ci est effectuée

par l'anhydride acétique en milieu pyridinique ; après différents temps de réaction, une partie aliquote est prélevée et chromatographiée sur papier imprégné de Kieselguhr dans le solvant hexane-acétone (85:15). Chaque acétate donne une bande distincte de Rf d'autant plus élevé que le nombre de groupements hydroxyles acétylés est plus grand. Quatre acétates de Rf respectifs 0,95 0,78 0,59 et 0,48 sont ainsi mis en évidence, ce qui indique la présence de quatre hydroxyles libres dans le composé initial. Après acétylation totale, le peracétate obtenu a un Rf de 0,72 dans le solvant hexane-acétone (95:5), il possède les mêmes propriétés spectrales que la xanthophylle d'origine.

Saponification. La présence d'une fonction ester dans le pigment est mise en évidence par saponification. Celle-ci est effectuée par une solution méthanolique de potasse à 5 %, elle donne un caroténoïde extrait par l'éther et des acides gras obtenus après acidification de la phase aqueuse et extraction par l'éther. Les acides gras sont méthylés par le diazométhane et les esters étudiés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne de DEGS à 180°.

L'acide palmitique est le constituant principal à côté d'un mélange d'acides linéaires à 12, 14 et 18 atomes de carbone. Le pourcentage de chaque acide est indiqué dans le tableau II.

TABLEAU II

Composition en acides gras du pigment caroténoïdique

Acides	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	C ₁₈	C _{18:1}
Pourcentage	18	5	48	18	11

La polarité du pigment résultant de la saponification a fortement augmenté, il donne une bande de Rf = 0,20 dans le solvant benzène-acétone (70:30), alors que le pigment initial possède un Rf = 0,60 dans le même solvant. Le produit saponifié présente le même spectre d'absorption et le même comportement chromatographique qu'un caroténoïde glucosidique,

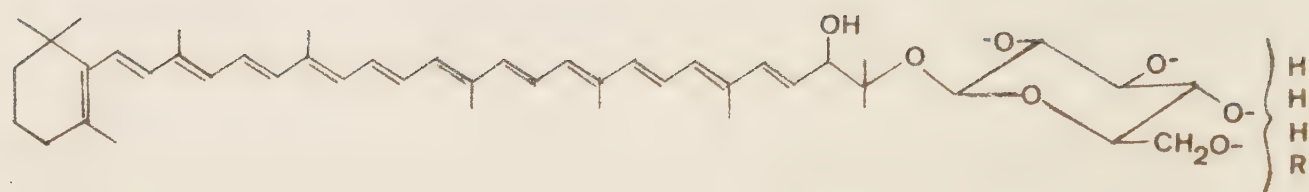
la phlei-xanthophylle isolée d'une souche de Mycobacterium phlei et étudiée par Hertzberg et Jensen (65). Pour prouver l'identité des deux composés nous avons cultivé M. phlei * sur milieu liquide de Shlegel (73) et extrait les caroténoïdes par le mélange acétone-méthanol (7:3) (74). Les caroténoïdes glucosidiques sont ensuite purifiés par chromatographie sur colonne d'acide silicique et élués à l'éther.

Après saponification, les caroténoïdes isolés de M. phlei et N. kirovani sont inséparables par chromatographie sur papier ainsi que les peracétates préparés à partir des deux composés.

Hydrolyse chlorhydrique. La présence de glucose dans le pigment de N. kirovani a été confirmée par hydrolyse par le chloroforme chlorhydrique du produit saponifié (75). Après 10 minutes de réaction, les phases chloroformique et aqueuse sont séparées. La phase aqueuse de l'hydrolysate est analysée par chromatographie en couches minces de gel de silice imprégné de NaH_2PO_4 0,2 M (76). La révélation par le chlorure de triphényl tétrazolium montre qu'elle renferme un sucre identifié au glucose ($R_f = 0,26$). La phase chloroformique contient le pigment qui a perdu son caractère fortement polaire initial, il migre dans le solvant hexane-acétone (97:3) avec un R_f de 0,44. Après purification par chromatographie préparative sur papier, le composé possède un spectre d'absorption déplacé vers les grandes longueurs d'onde ($\Delta\lambda_{\text{max}} = 12 \text{ nm}$), ses caractéristiques spectrales et chromatographiques sont celles du 3,4-déhydrotorulène (III) (65) obtenu dans les mêmes conditions à partir de la phlei-xanthophylle. Le traitement par le chloroforme acide a provoqué la coupure de la liaison osidique et l'élimination de l'hydroxyle allylique en 2' avec addition d'une double liaison au chromophore suivant le schéma de la figure 4.

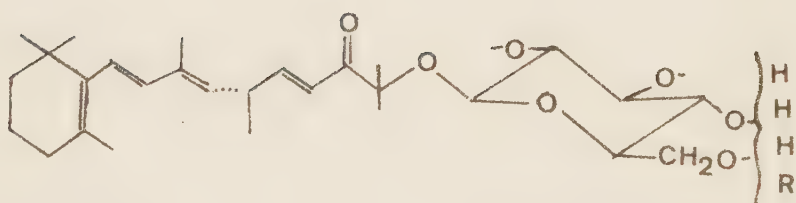
Le même traitement effectué sur le pigment initial estérifié (I) conduit également au 3,4-déhydrotorulène (III) et à des esters de glucose. Dans ce cas le glucose est mis en évidence après saponification de la phase chloroformique et élimination des sels de potassium sur Amberlite MB 3. Ce dernier résultat montre que la fonction ester est située sur le glucose.

* Nous remercions le Docteur M.K. Eimhjellen qui nous a procuré une souche de M. phlei Vera.



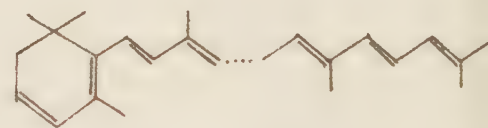
I $R = \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CO}-$

II $R = \text{H}$



IV $R = \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CO}-$

V $R = \text{H}$



III 3-4 déhydro-torulène

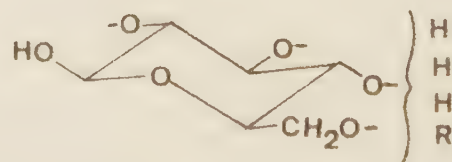


Figure 4. Schéma des réactions effectuées sur les phlei-xanthophylles

Oxydation par le parachloranile. La présence d'un hydroxyle libre en 2' sur le caroténoïde naturel est confirmée par oxydation avec le parachloranile. Cet oxydant doux, en présence d'iode et de lumière artificielle (77) transforme les hydroxyles allyliques en cétones. La réaction est suivie par chromatographie sur papier et spectrométrie visible. On obtient une diminution de la polarité et un accroissement de la longueur d'onde au maximum d'absorption qui se traduit par une modification de la couleur tendant vers le rouge puisqu'il y a formation d'une double liaison conjuguée avec le système polyénique de la chaîne (voir schéma). La réaction est effectuée avec le pigment naturel et avec le pigment saponifié. Dans les deux cas, on obtient un composé pourpre moins polaire. Le pigment saponifié (II) donne la 2'-céto-phlei-xanthophylle (V) identifiée par comparaison du comportement chromatographique et des propriétés spectrales avec le composé authentique, $R_f = 0,50$ sur papier dans le solvant benzène-acétone (70:30), $\lambda_{\max} = 495 \text{ nm}$ dans l'acétone.

L'étude de la cinétique de l'acétylation a montré la formation de quatre acétates ce qui indique la présence de quatre hydroxyles libres dans le composé initial. Il y a donc une seule molécule d'acides gras qui estérifie un hydroxyle du glucose. Le pigment est un mélange de mono-esters d'un même caroténoïde, le plus important étant le palmitate de phlei-xanthophylle (formule I figure 4).

Présence de 4-céto-phlei-xanthophylle.

L'étude des pigments d'une culture de N.kirovani âgée de 4 à 6 semaines a montré la formation en faible quantité d'un autre pigment. Il est inséparable du composé précédent par chromatographie mais les peracétates présentent des propriétés d'adsorption différentes. Dans le solvant hexane-acétone (95:5) les peracétates des 2 caroténoïdes ont pour R_f respectifs 0,48 et 0,72, le composé de R_f 0,72 correspondant à l'acétate de l'ester de phlei-xanthophylle, ils représentent respectivement 10 % et 90 % du mélange. Chaque peracétate a été isolé et son spectre visible enregistré dans l'acétone est représenté figure 5.

Le spectre du premier composé de R_f 0,48 a un profil beaucoup plus émoussé que celui du second composé. Seul le pic médian est net, les deux autres pics ne sont plus que des épaulements. Il est connu que la conjugaison d'un groupement carbonyle avec le système polyénique se traduit par une diminution de la structure fine du spectre et un déplacement assez faible du maximum d'absorption vers les plus grandes longueurs d'onde (69).

Le spectre du composé de R_f 0,48 est donc en faveur d'une structure cétonique. Après saponification et acétylation le pigment obtenu est identifié à l'acétate de la 4-céto-phlei-xanthophylle ; la 4-céto-phlei-xanthophylle a été également isolée de M. phlei (65), elle possède la formule I.

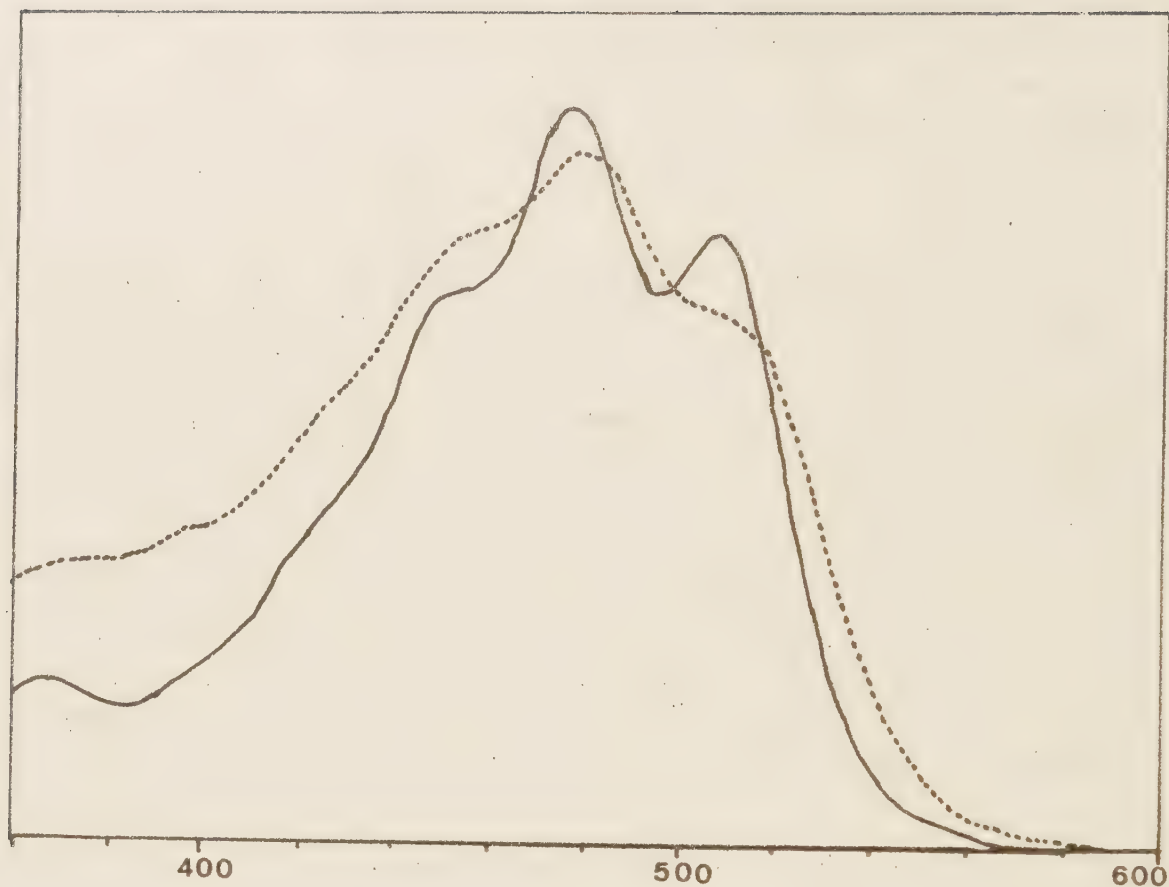
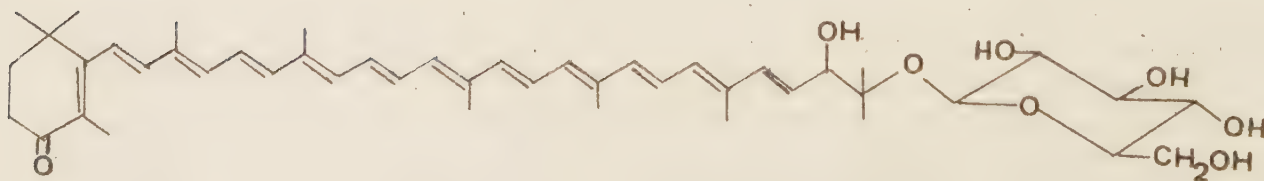


Figure 5. Spectres visibles en solution acétonique

— Rf = 0,72, acétate de l'ester de phlei-xanthophylle
 Rf = 0,48, acétate de l'ester de 4-céto-phlei-xanthophylle



Formule I. 4-céto-phlei-xanthophylle.

Nous avons ainsi mis en évidence dans Nocardia kirovani deux caroténoïdes glucosidiques, la phlei-xanthophylle et la 4-céto-phlei-xanthophylle sous forme d'esters d'acides gras. Bien que deux caroténoïdes présents dans M. phlei aient été décrits sous forme libre par Hertzberg et Liaaen-Jensen (65), nous avons pu les obtenir sous forme d'esters à partir de M. phlei en évitant la saponification des lipides totaux effectuée par Hertzberg et Liaaen-Jensen.

Il s'agit là des premiers caroténoïdes glucosidiques bactériens isolés sous forme d'esters d'acides gras ; récemment Kleinig et coll. ont trouvé dans Stigmantella aurantiaca deux caroténoïdes glucosidiques dans lesquels le glucose est estérifié par une molécule d'acides gras : ce sont des monoesters de 1,2'-dihydro-1'-hydroxy-3,4-déhydrotorulène glucoside et 1,2'-dihydro-1'-hydroxy-4-céto-torulène glucoside (78).

Nous avons montré (voir 2ème partie) que les pigments caroténoïdiques étaient localisés dans la paroi de N. kirovani.

ETUDE DES ACIDES, DES ALCOOLS ET DES CETONES

I. ETUDE DES ACIDES

La chromatographie de l'extrait étheré lipidique sur acide silicique selon Exterkate et coll. (79) fournit environ 40 % d'acides gras libres. Après méthylation par le diazométhane et chromatographie sur plaque de gel de silice dans le solvant hexane-éther (9:1) ils sont séparés en deux fractions :

- l'une, 15 % des esters totaux, contient les esters méthyliques des acides gras non hydroxylés de Rf 0,83.

- l'autre, 85 % des esters totaux, est constituée d'esters nocardiques de Rf 0,48.

A. Acides gras non hydroxylés.

Les acides gras de plusieurs espèces de *Nocardia* ont été étudiés par C. Bordet et G. Michel (80). Ils sont constitués d'un mélange d'acides saturés à chaîne droite ayant de 14 à 19 atomes de carbone, accompagnés d'acides éthyléniques et ramifiés.

Les acides gras de *N. kirovani* sont analysés par chromatographie gaz-liquide en utilisant une colonne polaire de DEGS et une colonne non polaire d'Apiezon L. Le pourcentage de chaque acide est donné dans le tableau III, on constate que l'acide palmitique est le constituant essentiel.

L'ester de l'acide en C₁₉ ramifié a le même temps de rétention que le tuberculostéarate de méthyle identifié dans *N. asteroides* et *N. brasiliensis* par C. Bordet (80) et dans *N. caviae*, *N. erythropolis* et *N. farcinica* par M. T. Maurice (81). On remarque l'absence d'acides supérieurs à C₁₉ en accord avec les résultats obtenus par Lanée et coll. (82) qui ont étudié comparativement les lipides de différentes souches de *Nocardia*.

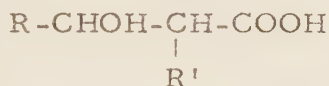
TABLEAU III

Composition des lipides en acides gras non hydroxylés

Acides	C ₁₄	C ₁₆	C _{16:1}	C ₁₈	C _{18:1}	C ₁₉ ^{ram.}
Pourcentage	3	47	3	14	22	11

B. Acides nocardiques.

Les acides nocardiques sont des acides de type mycolique α ramifiés, β hydroxylés qui répondent à la formule générale :



R et R' étant des radicaux hydrocarbonés.

La nature mycolique des acides nocardiques a été mise en évidence par G. Michel et coll. (56) et C. Bordet a déterminé la structure des acides nocardiques isolés de N. asteroides (83)(57)(58). Ce sont des acides mono, di et triéthyléniques qui renferment de 46 à 56 atomes de carbone. Les acides nocardiques ont été mis en évidence et étudiés dans de nombreuses souches de *Nocardia* : N. brasiliensis (82)(57)(84), N. rhodochrous (82)(85), N. pellegrino (82), N. opaca (86), N. farcinica, N. sumatra, N. erythropolis, N. caviae et N. kirovani (87).

Les esters nocardiques de N. kirovani ont été étudiés par spectrométrie de masse. Ils donnent le spectre représenté figure 6.

Les pics moléculaires sont absents, les premiers pics du spectre sont à (M - 18) et proviennent de la perte d'une molécule d'eau. Ils se situent à m/e = 850, 878, 904, 906, 932, 960.

On trouve les pics à (M - 50) qui correspondent à la perte simultanée d'une molécule d'eau et de méthanol, ils sont à m/e = 818, 846, 872, 874, 900, 928.

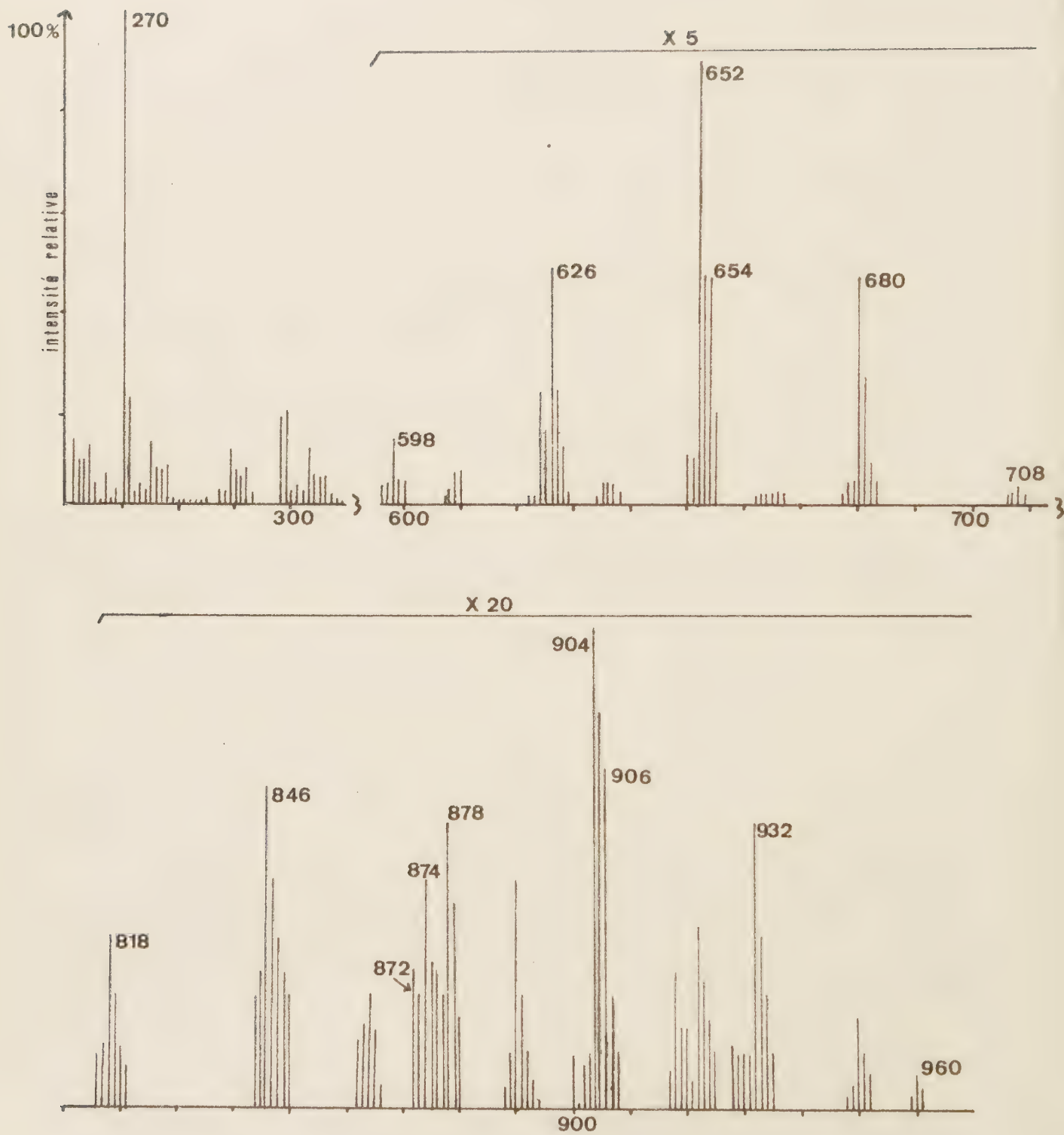
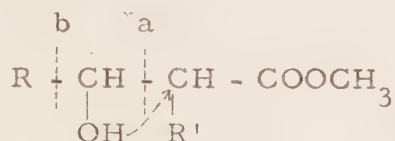


Figure 6. Spectre de masse des esters nocardiques..

Les pics de fragmentation proviennent essentiellement de la coupure pyrolytique selon a avec migration de H. Il y a formation d'aldéhydes R-CHO et d'esters de pyrolyse R'-CH₂-COOCH₃. La structure mycolique des esters nocardiques est ainsi mise en évidence.



La fragmentation selon b, en α de la fonction hydroxyle donne des pics d'intensité plus faibles que la coupure pyrolytique a.

Les pics d'aldéhydes, R-CHO se trouvent à m/e = 598, 626, 652, 654, 680, 708. Ils correspondent à des aldéhydes de C₄₂ à C₅₀ qui renferment 3 et 4 doubles liaisons.

Un pic important à m/e = 270 correspond à l'ester de pyrolyse C₁₇H₃₄O₂, il s'agit du palmitate de méthyle. La coupure selon b donne un pic de faible intensité à m/e = 299. La chaîne latérale des acides nocardiques est donc constituée, en majorité, d'un radical hydrocarboné saturé C₁₄H₂₉. Un pic beaucoup moins intense à m/e = 298 dû au stéarate de méthyle correspond à une chaîne latérale C₁₆H₃₃.

Les fragmentations observées permettent de déterminer les formules et poids moléculaires des esters nocardiques. Ils sont indiqués dans le tableau IV qui résume les résultats ci-dessus.

L'acide le plus abondant est en C₆₂ et renferme 4 insaturations. Le pic du fragment aldéhydique de poids moléculaire 652 correspondant à cet acide est également le plus important.

Hydrogénation des esters nocardiques.

Pour vérifier que les insaturations proviennent de doubles liaisons et non de cycles propaniques comme c'est le cas pour certains acides mycoliques (88), nous avons hydrogéné les esters nocardiques dans des conditions douces qui n'affectent pas les cycles propaniques. Les esters hydrogénés sont à nouveau soumis à la spectrométrie de masse (figure 7).

Les pics à (M - 18) et (M - 50) se retrouvent déplacés de 6 ou 8 unités de masse, ce qui correspond à l'hydrogénation de 3 ou 4 doubles liaisons. Les esters saturés subissent également la coupure pyrolytique mais on n'observe pas les pics correspondant aux fragments aldéhydiques. L'insaturation a donc une influence sur la stabilité des ions aldéhydiques : en l'absence de doubles liaisons ils se déshydratent. Le pic de l'ester de

TABLEAU IV

Pics des fragmentations obtenues par spectrométrie de masse des nocardates de méthyle

<u>Ester de pyrolyse *</u>		<u>Aldéhydes de pyrolyse</u>		<u>Esters nocardiques</u>	
m/e	Formule	nature de la chaîne latérale	m/e	Formules	m/e=M-18 m/e=M-50 M Formules Δ
270	$C_{17}H_{34}O_2$	$C_{14}H_{29}$	598	$C_{42}H_{78}O$	850 818 868 $C_{59}H_{112}O_3$ 3
270	$C_{17}H_{34}O_2$	$C_{14}H_{29}$	626	$C_{44}H_{82}O$	878 846 896 $C_{61}H_{116}O_3$ 3
270	$C_{17}H_{34}O_2$	$C_{14}H_{29}$	652	$C_{46}H_{84}O$	904 872 922 $C_{63}H_{118}O_3$ 4
270	$C_{17}H_{34}O_2$	$C_{14}H_{29}$	654	$C_{46}H_{86}O$	906 874 924 $C_{63}H_{120}O_3$ 3
270	$C_{17}H_{34}O_2$	$C_{14}H_{29}$	680	$C_{48}H_{88}O$	932 900 950 $C_{65}H_{122}O_3$ 4
270	$C_{17}H_{34}O_2$	$C_{14}H_{29}$	708	$C_{50}H_{92}O$	960 928 978 $C_{67}H_{126}O_3$ 1

* Le fragment à m/e = 298, correspondant à l'ester de pyrolyse $C_{19}H_{38}O_2$, de faible intensité, n'est pas indiqué dans ce tableau.

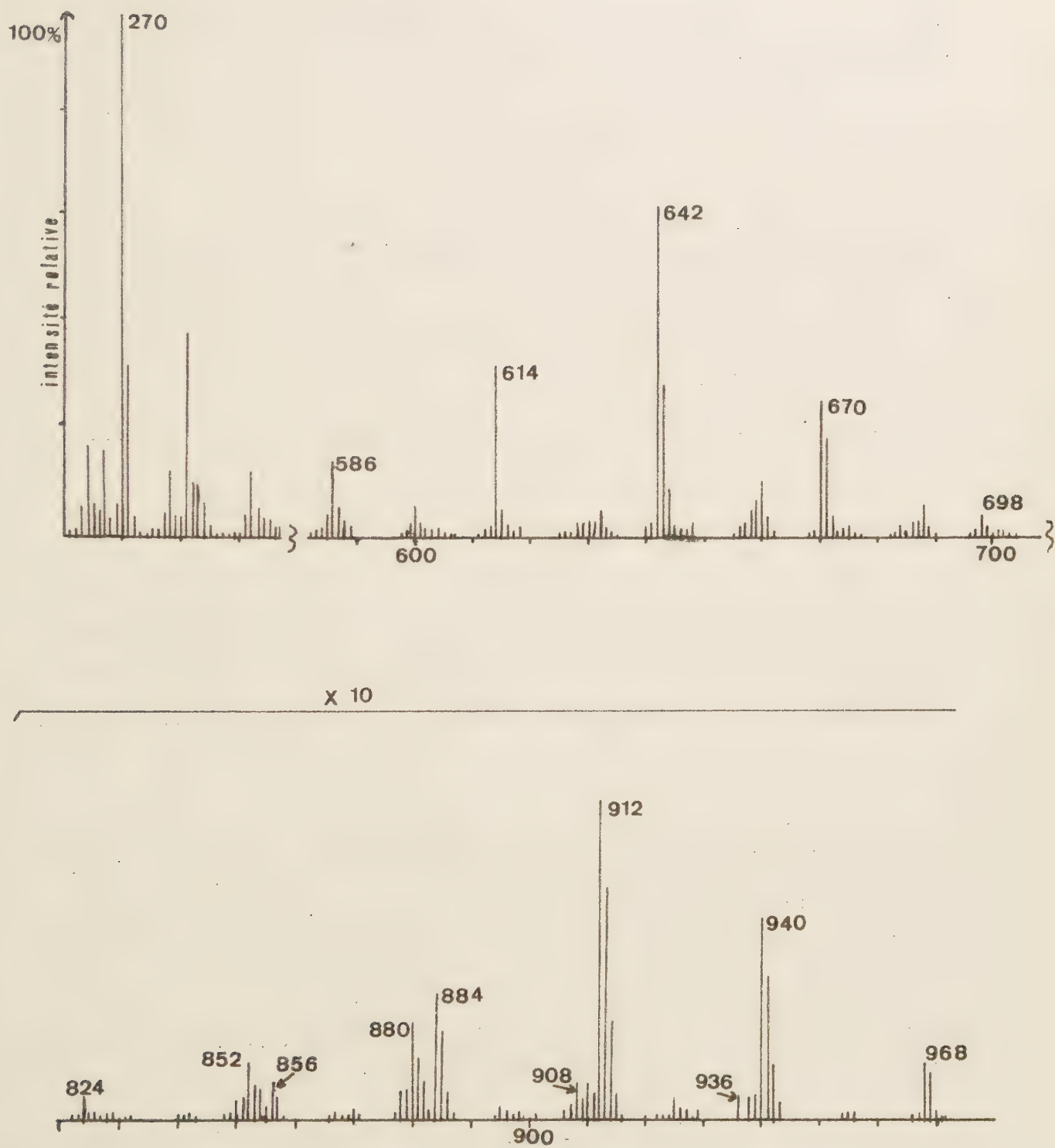


Figure 7. Spectre de masse des esters nocardiques hydrogénés.

pyrolyse à $m/e = 270$ est inchangé. Ces différents résultats sont résumés dans le tableau V.

TABLEAU V

Pics des fragmentations obtenues par spectrométrie de masse des esters méthyliques des acides nocardiques hydrogénés.

Ester de pyrolyse m/e	Aldéhydes de pyrolyse après déshydratation m/e	Aldéhydes de pyrolyse m/e	M	M - 18	M - 50
270	586	604	874	856	824
270	614	632	902	884	852
270	642	660	930	912	880
270	670	688	958	940	908
270	698	716	986	968	936

Les acides nocardiques isolés de N. kirovani sont donc un mélange d'acides triéthyléniques $C_{58}H_{110}O_3$, $C_{60}H_{114}O_3$ et $C_{62}H_{118}O_3$ et tétraéthyléniques : $C_{62}H_{116}O_3$, $C_{64}H_{120}O_3$, $C_{66}H_{124}O_3$; la chaîne latérale saturée comporte essentiellement 14 atomes de carbone.

On remarque, comme dans le cas de plusieurs souches de *Nocardia* (58)(87) que les acides les plus insaturés, tétraéthyléniques, sont ceux dont le nombre d'atomes de carbone est le plus élevé.

L'acide de poids moléculaire le plus élevé signalé jusqu'à présent dans un *Nocardia* est l'acide triéthylénique $C_{60}H_{114}O_3$ constituant d'un glycolipide de N. brasiliensis (84). La souche de N. kirovani que nous avons étudiée renferme une nouvelle série d'acides de C_{62} à C_{66} de poids moléculaire supérieur à ceux des acides nocardiques isolés jusqu'à présent et qui sont d'autre part tétraéthyléniques.

L'étude des acides nocardiques de différentes souches de *Nocardia* (87) a montré qu'ils recouvraient une échelle très étendue de poids moléculaire, sans aucune discontinuité. Tous les acides de C_{34} à C_{66} ont été mis en évidence. Les acides nocardiques étudiés appartiennent à une même série : chaîne principale linéaire saturée ou insaturée avec 1, 2, 3 ou 4 doubles liaisons et chaîne latérale saturée comportant de 10 à 16 atomes de carbone.

Nous avons également recherché dans les lipides de *N. kirovani* la présence d'alcools et de cétones de haut poids moléculaire qui s'apparentent aux nocardols (89)(90) et nocardones (91)(92) identifiés et étudiés chez différents *Nocardia*.

II. ETUDE DES NOCARDOLS

Ils existent dans les extraits lipidiques sous forme estérifiée.

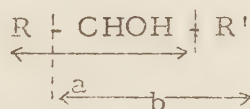
La saponification des lipides neutres fournit une fraction insaponifiable qui contient 60 % d'alcools. Ils sont purifiés par chromatographie en couches minces préparative sur plaques de gel de silice dans le solvant hexane-éther (96:4) $R_f = 0,22$.

Le spectre infra-rouge présente les bandes d'absorption caractéristiques de la fonction hydroxyle à $2,90 \mu m$ et des doubles liaisons à $6,06 \mu m$.

Leur structure a été élucidée par spectrométrie de masse, (figure 8).

Le spectre obtenu ne présente pas de pics moléculaires ce qui est normal pour des alcools de haut poids moléculaire. Les premiers pics proviennent de la perte d'une molécule d'eau et se situent à $m/e = 792, 818, 820, 846, 848, 874$. Ils correspondent à des alcools tri et tétraéthyléniques de 57 à 63 atomes de carbone dont les formules brutes sont indiquées dans le tableau VI.

Le plus abondant est l'alcool en C_{61} , tétraéthylénique. Les fragmentations observées sont dues essentiellement aux coupures en α de la fonction alcool et donnent deux séries de pics correspondant aux fragments a et b ci-dessous :



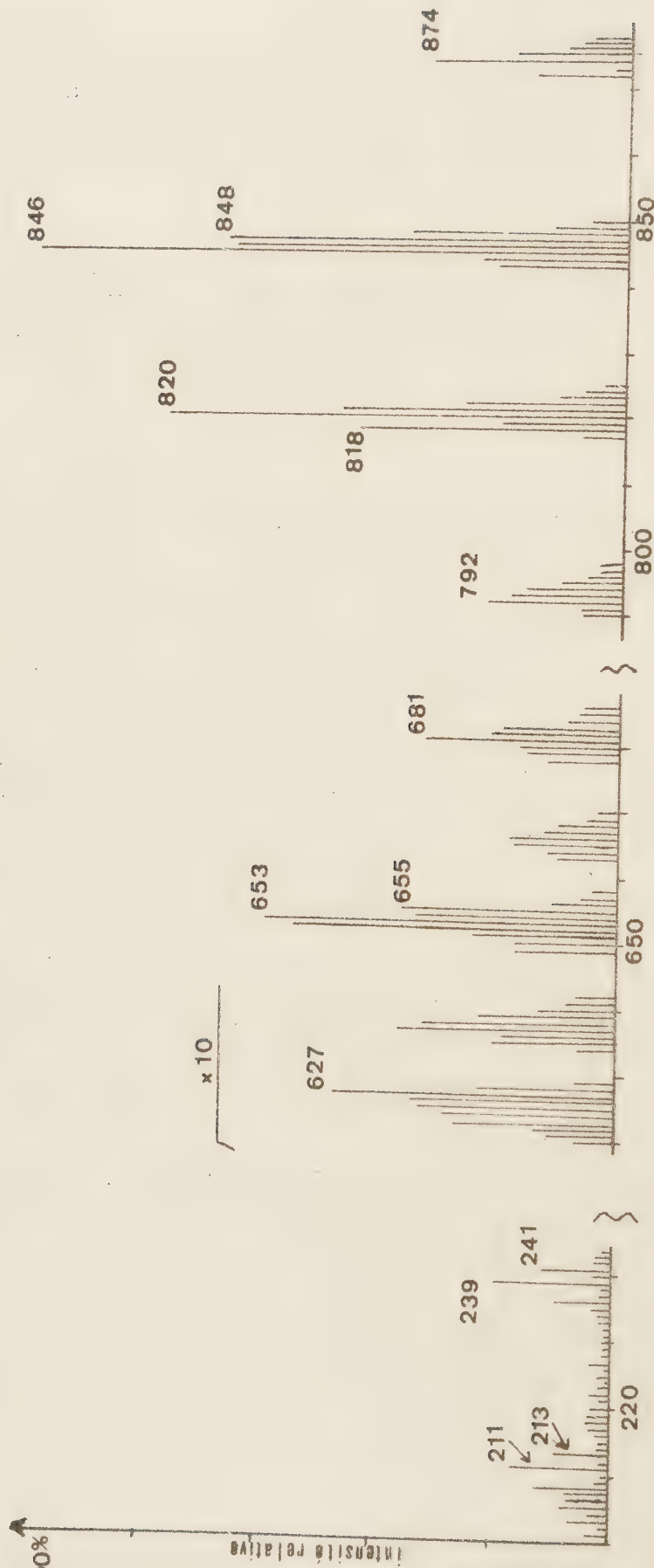


Figure 8. Spectre de masse des nocardols.

Les pics qui proviennent du fragment a sont à :

m/e = 627	$C_{44}H_{83}O$	avec 3 doubles liaisons	
m/e = 653	$C_{46}H_{85}O$	" 4	" le plus intense
m/e = 655	$C_{46}H_{87}O$	" 3	"
m/e = 681	$C_{48}H_{89}O$	" 4	"

Les pics du fragment b se retrouvent à :

m/e = 211, 213, 239 et 241. Ils correspondent à une chaîne à 14 et 16 atomes de carbone qui renferme une double liaison pour les pics à m/e = 211 et 239.

Il s'agit donc d'un mélange d'alcools à nombre impair d'atomes de carbone, triéthyléniques : $C_{57}H_{110}O$, $C_{59}H_{114}O$, $C_{61}H_{118}O$ et tétraéthyléniques : $C_{59}H_{112}O$, $C_{61}H_{116}O$ et $C_{63}H_{120}O$.

TABLEAU VI

Nature des alcools identifiés par spectrométrie de masse

M - 18	M Poids mol.	Formule de l'alcool	Nombre de doubles liaisons
792	810	$C_{57}H_{110}O$	3
818	836	$C_{59}H_{112}O$	4
820	838	$C_{59}H_{114}O$	3
846	864	$C_{61}H_{116}O$	4
848	866	$C_{61}H_{118}O$	3
874	892	$C_{63}H_{120}O$	4

III. ETUDE DES NOCARDONES

La fraction insaponifiable des lipides renferme essentiellement un mélange d'alcools et de cétones de poids moléculaires élevés.

Les cétones sont séparées des alcools par chromatographie sur couches minces en utilisant le solvant hexane-éther (96:4) $R_f = 0,50$.

La fonction cétone est mise en évidence par spectrométrie infra-rouge, le spectre présente la bande d'absorption caractéristique à $5,85 \mu m$.

Un échantillon soumis à la spectrométrie de masse donne le spectre représenté figure 9.

Les pics moléculaires sont à $m/e = 806, 808, 834, 836, 862, 864$ et 890 ; ils correspondent à des cétones triéthyléniques de 57 à 63 atomes de carbone. Les formules brutes de chaque composé sont données dans le tableau VII.

TABLEAU VII

Nature des cétones identifiées par spectrométrie de masse

M	Formule de la cétone	Nombre de doubles liaisons
806	$C_{57}H_{106}O$	4
808	$C_{57}H_{108}O$	3
834	$C_{59}H_{110}O$	4
836	$C_{59}H_{112}O$	3
862	$C_{61}H_{114}O$	4
864	$C_{61}H_{116}O$	3
890	$C_{63}H_{118}O$	4

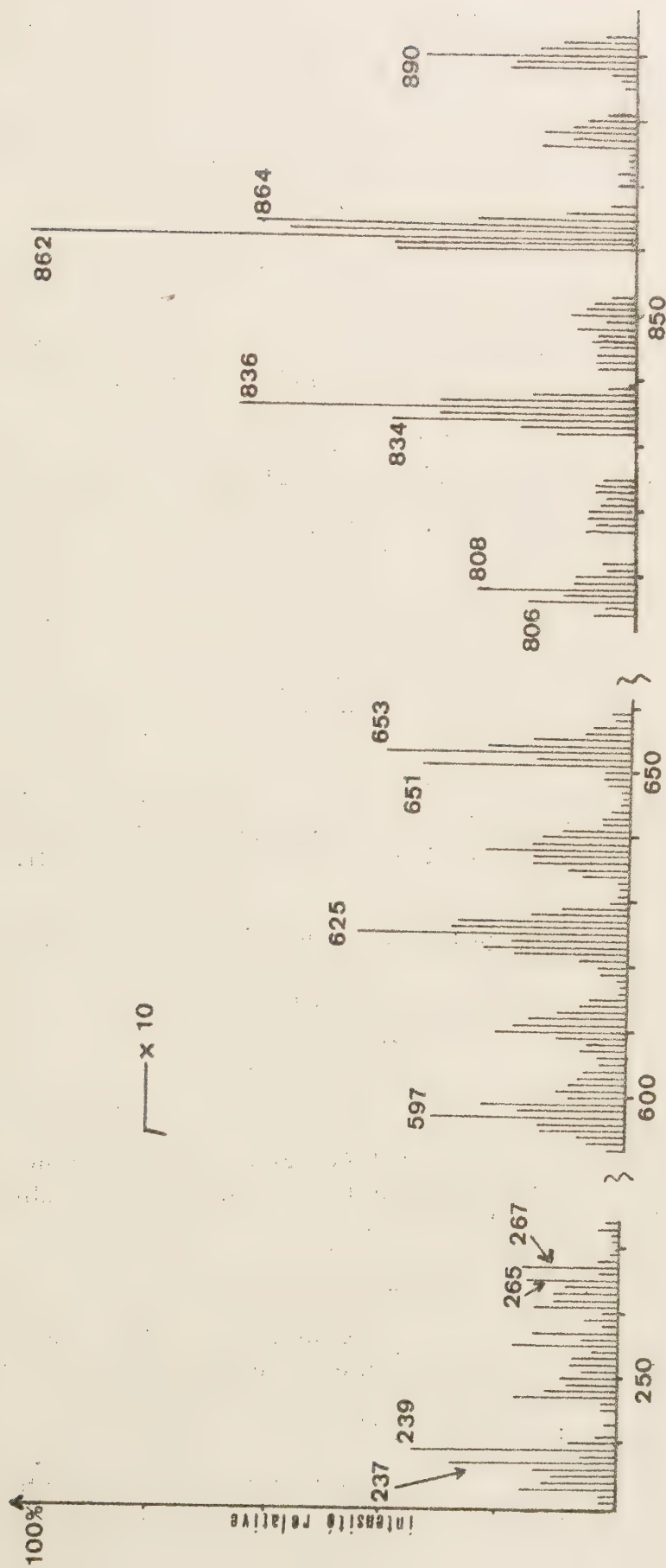


Figure 9. Spectre de masse des nocardones.

Le constituant le plus important est la cétone en C_{61} tétraéthylénique.

On retrouve les pics de coupure en α de la fonction cétone à :

$m/e = 597$	correspondant au fragment	$C_{42}H_{77}O$	avec 3 doubles liaisons
$m/e = 625$	"	"	"
$m/e = 651$	"	"	"
$m/e = 653$	"	"	"

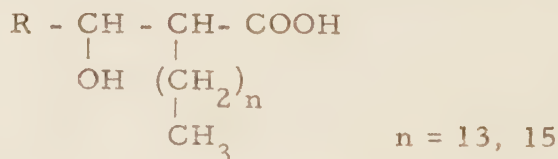
et à $m/e = 237, 239, 265$ et 267 . Ils proviennent de chaînes à 16 et 18 atomes de carbone, saturées ou monoéthyléniques.

Les nocardones isolées de N.kirovani sont donc constituées d'un mélange de cétones triéthyléniques $C_{57}H_{108}O$, $C_{59}H_{112}O$, $C_{61}H_{116}O$ et tétraéthyléniques $C_{57}H_{106}O$, $C_{59}H_{110}O$, $C_{61}H_{114}O$ et $C_{63}H_{118}O$.

DISCUSSION

L'étude par spectrométrie de masse des acides nocardiques, nocardols et nocardones isolés de N.kirovani permet d'attribuer à ces composés les formules indiquées dans le tableau VIII.

Acides nocardiques : ils peuvent s'écrire sous la forme générale :



La ramification est constituée principalement d'une chaîne hydrocarbonée à 11 atomes de carbone ($n = 13$). R est un radical hydrocarboné tri ou tétraéthylénique de C_{41} à C_{49} .

Nocardols : $R - CHOH - R'$

R' renferme 13 ou 15 atomes de carbone, il est saturé ou monoéthylénique ; R renferme 13 à 17 atomes de carbone et 3 ou 1 doubles liaisons.

Nocardones : $R - CO - R'$

R' renferme 15 ou 17 atomes de carbone, il est saturé ou mono-insaturé ; R renferme 41 à 45 atomes de carbone avec 3 ou 4 doubles liaisons.

TABLEAU VIII

Composition des lipides de N.kirovani en acides, alcools et cétones à haut poids moléculaire .

Nombre de doubles liaisons	Acides nocardiques	Nocardols	Nocardones
3	$C_{58}H_{110}O_3$	$C_{57}H_{110}O$	$C_{57}H_{108}O$
	$C_{60}H_{114}O_3^*$	$C_{59}H_{114}O^*$	$C_{59}H_{112}O$
	$C_{62}H_{118}O_3^*$	$C_{61}H_{118}O^*$	$C_{61}H_{116}O$
1	$C_{62}H_{116}O_3^*$	$C_{59}H_{112}O$	$C_{57}H_{106}O$
	$C_{64}H_{120}O_3^*$	$C_{61}H_{116}O^*$	$C_{59}H_{110}O$
	$C_{66}H_{124}O_3$	$C_{63}H_{120}O$	$C_{61}H_{114}O^*$
			$C_{63}H_{118}O$

Les composés existant en quantité prépondérante sont marqués d'un astérisque.

La comparaison de ces résultats avec ceux qui ont été obtenus par C. Bordet (57)(58) pour les composés à haut poids moléculaire isolés de N.asteroides permet plusieurs constatations :

- les homologues les plus abondants ont un nombre pair d'atomes de carbone pour les acides et un nombre impair d'atomes de carbone pour les alcools et les cétones.

- les acides nocardiques, nocardols et nocardones isolés de N.kirovani comme ceux qui ont été isolés de N.asteroides présentent une analogie structurale. Cette analogie a déjà été observée par Lanéeille entre

les acides nocardiques et les cétones de N. brasiliensis (92). La localisation des doubles liaisons dans les composés à haut poids moléculaire de N. asteroides (58) a permis de définir avec précision les similitudes entre les trois composés. Cette analogie de structure est liée à une origine biogénétique commune pour les alcools, cétones et acides qui proviennent d'un céto-acide précurseur commun (58).

- les acides nocardiques, nocardols et nocardones isolés de N. kirovani ont en moyenne 57 à 66 atomes de carbone alors que ceux de N. asteroides sont sensiblement plus courts, ils ont de 47 à 59 atomes de carbone.

- les composés isolés de N. kirovani renferment 3 et 4 doubles liaisons alors que ceux de N. asteroides sont mono, di et triéthyléniques. L'allongement de la chaîne principale s'accompagne de l'addition d'une double liaison. Cependant, dans le cas des acides nocardiques, la chaîne latérale renferme toujours le même nombre d'atomes de carbone : 14 pour N. kirovani et 12 ou 14 pour N. asteroides. La longueur de la chaîne latérale des acides du type mycolique est un critère qui permet de différencier les *Nocardia* et les mycobactéries (93). Les acides mycoliques libèrent par pyrolyse les acides en C_{20} ou C_{22} alors que les acides nocardiques donnent des acides de C_{10} à C_{16} .

Dans le cas des nocardols et nocardones, la fonction oxygénée est toujours située près d'une extrémité de la chaîne carbonée. La formule générale $R-CO-(CH_2)_n-CH_3$ avec $n = 12, 14$ pour les alcools et cétones de N. asteroides se retrouve dans les alcools de N. kirovani et avec $n = 14$ et 16 dans les cétones. Dans ces deux derniers composés, le groupement $(CH_2)_n-CH_3$ peut également être remplacé par un fragment monoéthylénique à même nombre d'atomes de carbone. Il faut noter que récemment un acide de type mycolique avec une chaîne latérale monoéthylénique a été isolé à partir d'une souche de N. asteroides par Ionedá et coll. (85), un autre acide α ramifié, β hydroxylé à chaîne latérale insaturée a été trouvé à partir d'un glycolipide de Brévibacterium thio-génitalis (94). Dans la souche de N. kirovani étudiée, seuls les nocardols et les nocardones subissent une désaturation dans la plus courte chaîne hydrocarbonée ; la ramification des esters nocardiques $C_{14}H_{29}$ est toujours saturée.

ETUDE DES TRIGLYCERIDES

Une fraction lipidique importante de l'extract chloroforme-méthanol-eau (10:10:1) est constituée d'un mélange de triglycérides. Les triglycérides sont des constituants habituels des lipides bactériens et leur présence a été montrée chez les *Nocardia* (95).

Analysés par chromatographie en couches minces de gel de silice dans le solvant hexane-éther (4:1) ils donnent 2 taches de R_f voisins 0,71 et 0,78. Les composés correspondants A et B ont été obtenus par chromatographie en couches minces préparative.

I. TRIGLYCERIDE A

Il a le même comportement chromatographique que la tripalmitine. L'hydrolyse acide libère du glycérol et des acides gras. Le glycérol est mis en évidence par chromatographie sur papier dans le solvant n-butanol-acide acétique-eau (65:10:25) en présence de glycérol témoin et révélation par le système periodate-benzidine (96). Les acides gras sont étudiés sous forme d'esters méthyliques à la chromatographie gaz-liquide, en utilisant une colonne de DEGS à 180°. Ce sont des acides en C_{14} , C_{16} , C_{18} et $C_{18:1}$ dans les proportions respectives 5 : 41 : 19 : 35.

La structure du glycéride a été confirmée par la spectrométrie de masse du triglycéride naturel et du triglycéride hydrogéné.

Spectres de masse.

Les triglycérides donnent des spectres de masse caractéristiques qui ont été étudiés par Ryhage et Stenhagen (97), Barber et coll. (98) et plus récemment par Lauer et coll. (99)(100). Ces derniers auteurs utilisent des molécules deutérées pour élucider les mécanismes de fragmentation.

Le spectre de masse d'un triglycéride présente le pic moléculaire M et le pic à M - 18. Les principaux pics de fragmentation se situent à :

(M - RCOO), ils proviennent de la perte du groupement acyloxy de la molécule entière. Dans le cas de triglycéride mixte, un pic est obtenu pour le départ de chaque groupement présent dans la molécule. D'après les travaux de Lauer et coll (99), l'intensité du pic augmente avec la longueur de la chaîne hydrocarbonée de l'acide. Chaque pic (M - RCOO) est accompagné d'un pic moins important (M - RCOOH).

Dans le cas de triglycérides mixtes, des pics de faibles intensités sont obtenus à partir des ions M - (R₁ ou R₃COOCH₂) alors que l'ion M - (R₂COOCH₂) ne se forme pas ou bien donne un pic très faible. Ces pics peuvent être utilisés pour déterminer la structure des triglycérides mixtes.

Les ions acyles (RCO) correspondant à chaque acide sont intenses. Dans le cas de triglycéride renfermant un acide gras insaturé, un pic important se situe à (RCO - H).

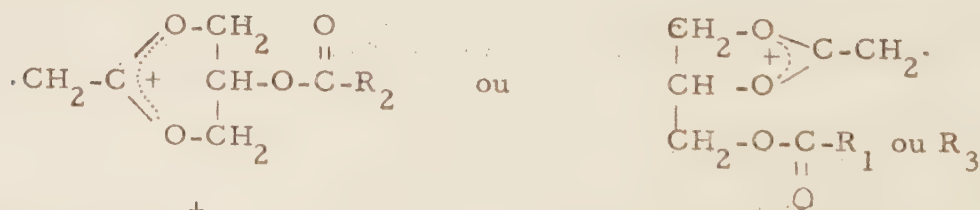
On trouve également des séries de pics à :

(RCO + 74), (RCO + 115), (RCO + 128), (RCO + 128 + 14 n). Les études faites avec les glycérides deutérés sur la molécule de glycérol montrent que la partie glycérol entre dans la composition de ces ions. En accord avec les mesures de masse, les structures suivantes ont été proposées :

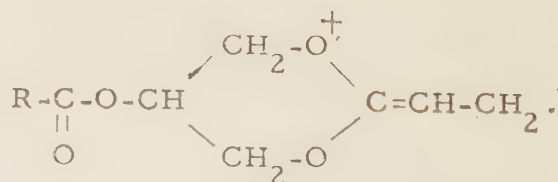
Ion (RCO + 74)⁺ :



Ion (RCO + 115)⁺ :

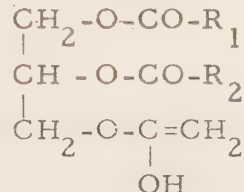


Ion (RCO + 128)⁺ :



Les ions ($\text{RCO} + 128 + 14 n$) diffèrent de celui-ci par la présence d'unités $-\text{CH}_2$ qui proviennent de la chaîne de l'acide gras.

Enfin, il faut signaler que les triglycérides subissent le réarrangement de Mac Lafferty (101) conduisant à l'ion :



Un pic qui correspond à ce dernier ion déshydraté est également présent.

Les pics obtenus sur les spectres de masse du triglycéride A, avant et après hydrogénation sont résumés dans le tableau IX.

Le spectre du triglycéride naturel ne présente ni les pics moléculaires, ni les pics à $M - 18$, ni les pics qui proviennent du réarrangement selon Mac Lafferty. Les pics des ions acyles RCO se retrouvent à 211, 239, 265 et 267, correspondant aux acides en C_{14} , C_{16} , C_{18} et $\text{C}_{18:1}$ mis en évidence par chromatographie en phase gazeuse.

On remarque le pic à $m/e = 264$, ($\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{CO} - \text{H}$) qui provient de l'acide gras insaturé, ce pic est plus intense que le pic à $m/e = 265$: ($\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{CO}$).

Le spectre de masse du triglycéride après hydrogénation est caractéristique. On retrouve les ions acyles hydrogénés à $m/e = 211$, 239 et 267. Les pics moléculaires sont à 806, 834 et 862 ce qui conduit à un mélange de triglycérides mixtes. Compte tenu de ce fait, on ne peut déterminer la position des différents acides sur la molécule de glycérol par la hauteur relative des pics à ($M - \text{RCOOCH}_2$).

II. TRIGLYCERIDE B

Par hydrolyse chlorhydrique, il donne du glycérol mis en évidence par chromatographie sur papier et un mélange d'acides gras.

Etude des acides gras.

Les acides gras après méthylation sont analysés par chromatographie en couches minces, ils donnent deux taches voisines de R_f 0,50 et 0,57 dans le solvant hexane-éther (19:1). Chaque composé est préparé. Le composé de $R_f = 0,50$ est constitué essentiellement d'esters d'acides en C_{16} (56 %) et $\text{C}_{18:1}$ (38 %) avec une faible proportion d'acides en C_{14} (3 %) et C_{18} (3 %) identifiés par chromatographie gaz-liquide.

TABLEAU IX

Pics de fragmentation obtenus par spectrométrie de masse du triglycéride A,
avant et après hydrogénation

Nature des fragments	Triglycéride A hydrogéné	Triglycéride A naturel
RCO	211, 239, 267	211, 239, 265, 267
RCO - 1	264	264
RCO + 74	285, 313, 341	285, 313, 339, 341
RCO + 115	326, 354, 382	326, 354, 380, 382
RCO + 128	339, 367, 395	339, 367, 393, 395
RCO + 128 + 14 n	409, 423, 437, 451 465, 479, 493, 507 521.	409, 423, 437, 451 465, 479, 493, 507
M - RCOO	523, 551, 579, 607	523, 551, 577, 579, 605
Réarrangement selon Mac Lafferty	638, 666, 694 après déshydratation 620, 648, 676	
M - 18	788, 816, 844	
M	806, 834, 862	

Le composé de $R_f = 0,57$ est étudié par spectrométrie de masse, il renferme une série d'acides homologues de C_{35} à C_{45} dont les représentants majeurs sont à nombre impair d'atomes de carbone, ces acides sont tri et tétraéthyléniques. Le spectre de masse des esters hydrogénés confirme ces résultats. Le tableau X donne les pics moléculaires observés sur le spectre, les formules brutes des différents esters et le pourcentage de chaque constituant calculé d'après la hauteur du pic de l'ion moléculaire. Les acides quantitativement les plus importants ont 37, 39 et 41 atomes de carbone.

Le spectre UV des acides éthyléniques enregistré dans l'hexane ne montre aucune absorption correspondant à des doubles liaisons en position conjuguée ou à une double liaison conjuguée avec le carboxyle.

Il était intéressant de connaître la nature linéaire ou ramifiée de ces acides inhabituels. La spectrométrie de masse des esters méthyliques hydrogénés ne met en évidence aucune ramification à l'intérieur de la chaîne. Pour confirmer la nature linéaire de la chaîne, nous avons réduit les esters en hydrocarbures : les esters sont transformés en alcools par action de l'hydrure de lithium et d'aluminium (102) puis en composés iodés par l'iode et le phosphore rouge (103), ces derniers sont à nouveau réduits en hydrocarbures. Ils sont hydrogénés et étudiés par chromatographie gaz-liquide en utilisant une colonne de silicone SE 30 à 10 % de 80 cm de longueur à 300° en présence d'un mélange témoin d'hydrocarbures normaux en C_{34} , C_{36} , C_{38} *. Les distances de rétention des hydrocarbures du mélange analysé se situent sur la droite représentant le log de la distance de rétention en fonction du nombre d'atomes de carbone (104). Les plus abondants peuvent être identifiés aux hydrocarbures normaux en C_{35} , C_{37} , C_{39} , C_{41} .

Les esters méthyliques hydrogénés ont été oxydés par l'anhydride chromique (80)(105). L'oxydation a été également effectuée sur l'ester méthylique de l'acide en C_{32} et sur un ester ramifié iso à chaîne hydrocarbonée plus courte. Dans les conditions opératoires utilisées, l'oxydation donne de l'acétone s'il s'agit d'une chaîne hydrocarbonée iso et de la méthyléthylcétone dans le cas d'une chaîne antéiso ; la cétone formée est mise en évidence par son dérivé 2,4-dinitrophénylé en présence d'hydrazones témoins par chromatographie en couches minces de gel de silice dans le solvant hexane-éther-alcool (88:10:2) (106). Dans le cas des esters étudiés et de l'acide en C_{32} , aucune tache correspondant aux hydrazones témoins n'est obtenue, par contre l'ester témoin ramifié iso donne une tache identique à la 2,4-dinitrophénylhydrazone de l'acétone.

* Nous remercions Monsieur J. Asselineau, Professeur à l'Université de Toulouse, qui nous a fourni ce mélange d'hydrocarbures témoins.

TABLEAU X

Identification des esters à haut poids moléculaire du triglycéride B par spectrométrie de masse

Esters naturels				Esters hydrogénés	
M	Formule	Pourcentage	Δ	M	Formule
528	$C_{36}H_{64}O_2$	6	4	536	$C_{36}H_{72}O_2$
530	$C_{36}H_{66}O_2$	6,5	3		
544	$C_{37}H_{68}O_2$	6	3	550	$C_{37}H_{74}O_2$
556	$C_{38}H_{68}O_2$	3	4	564	$C_{38}H_{76}O_2$
558	$C_{38}H_{70}O_2$	11,5	3		
572	$C_{39}H_{72}O_2$	4	3	578	$C_{39}H_{78}O_2$
584	$C_{40}H_{72}O_2$	7	4	592	$C_{40}H_{80}O_2$
586	$C_{40}H_{74}O_2$	10	3		
598	$C_{41}H_{74}O_2$	3	4	606	$C_{41}H_{82}O_2$
600	$C_{41}H_{76}O_2$	3	3		
612	$C_{42}H_{76}O_2$	9	4	620	$C_{42}H_{84}O_2$
614	$C_{42}H_{78}O_2$	8,5	3		
626	$C_{43}H_{78}O_2$	1,5	4	634	$C_{43}H_{86}O_2$
628	$C_{43}H_{80}O_2$	1,5	3		
640	$C_{44}H_{80}O_2$	7	4	648	$C_{44}H_{88}O_2$
642	$C_{44}H_{82}O_2$	6,5	3		
654	$C_{45}H_{82}O_2$	1	4	662	$C_{45}H_{90}O_2$
656	$C_{45}H_{84}O_2$	1	3		
668	$C_{46}H_{84}O_2$	4,5	4	676	$C_{46}H_{92}O_2$
670	$C_{46}H_{86}O_2$	2,5	3		
696	$C_{48}H_{88}O_2$	1	4		

Le spectre de résonance magnétique nucléaire des esters naturels est également en faveur d'une chaîne hydrocarbonée linéaire. En utilisant comme référence l'intensité du signal à 3,65 ppm correspondant aux 3 protons du groupement $\text{O}-\text{CH}_3$, le nombre de protons du groupement terminal déplacés à 0,92 ppm est estimé à 3,6 et ces protons apparaissent sous forme de triplet. L'imprécision de la mesure est due au nombre important des protons de la chaîne hydrocarbonée qui donnent un pic intense centré à 1,30 ppm. La présence d'une ramification donnerait un nombre plus élevé de protons déplacés à 0,92 ppm qui seraient alors sous forme d'un doublet.

Ainsi, la spectrométrie de masse des esters hydrogénés, l'analyse par la chromatographie gaz-liquide des hydrocarbures provenant de la réduction des esters, l'oxydation chromique et la spectrométrie R.M.N. sont en faveur d'une chaîne hydrocarbonée linéaire pour les acides de poids moléculaire élevé isolés à partir des triglycérides. La présence de ces acides à nombre impair d'atomes de carbone est assez curieuse, ils pourraient provenir de la condensation de deux acides en C_{16} ou C_{18} après ω -oxydation avec élimination d'une molécule de CO_2 . Il faut signaler que C. Asselineau et coll (107) ont isolé récemment de Mycobacterium phlei des acides linéaires pentaéthyléniques en C_{36} .

Etude du triglycéride B par spectrométrie de masse.

Les triglycérides naturels et hydrogénés ont été soumis à la spectrométrie de masse. Le spectre des triglycérides hydrogénés est représenté figure 10.

Les triglycérides hydrogénés ne présentent pas de pics moléculaires, néanmoins le spectre est caractéristique. Les pics des ions acyloxy qui correspondent respectivement aux acides de poids moléculaire moyen et aux acides à haut poids moléculaire les plus abondants sont à $m/e =$
 $239 : \text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{CO}$; $267 : \text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{CO}$; $533 : \text{C}_{36}\text{H}_{73}\text{CO}$; $561 : \text{C}_{38}\text{H}_{77}\text{CO}$;
 $589 : \text{C}_{40}\text{H}_{81}\text{CO}$.

On retrouve les séries de pics à :

$(\text{RCO} + 74)$ à $m/e = 313, 341, 607, 635, 663$
 $(\text{RCO} + 115)$ à $m/e = 354, 382, 648, 676, 704$
 $(\text{RCO} + 128)$ à $m/e = 367, 395, 661, 689, 717$
 $(\text{RCO} + 128 + 14n)$

Les ions qui proviennent du départ des radicaux acyles ont pour valeur $m/e = 551, 579, 607$. Ils correspondent à l'élimination d'un groupement acyle d'un acide en C_{37} , C_{39} ou C_{41} .

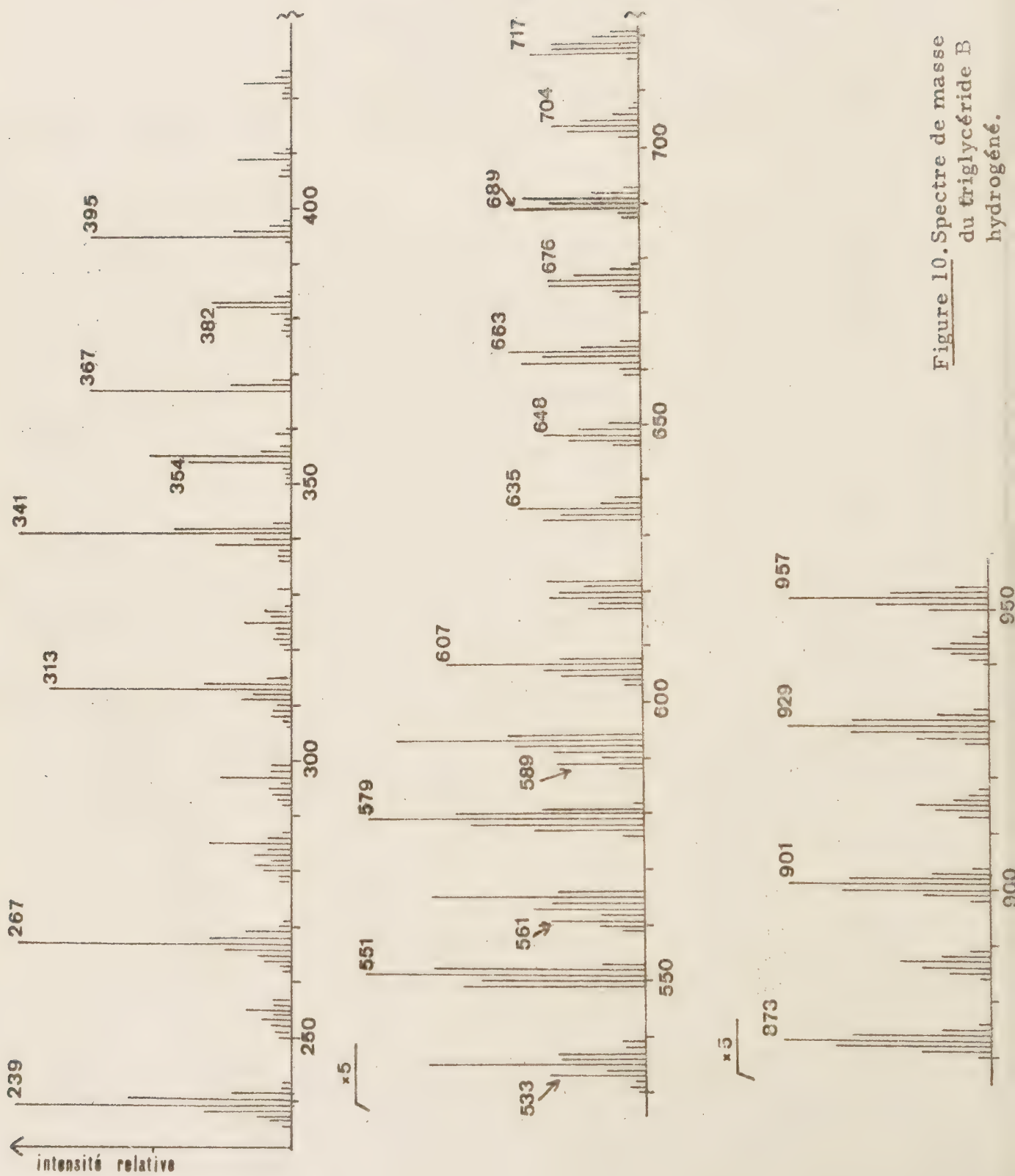


Figure 10. Spectre de masse du triglycéride B hydrogéné.

Les pics à $m/e = 873, 901, 929, 957$ sont dus à la perte de RCO d'un acide de poids moléculaire moyen. Ces deux séries de pics montrent que 2 hydroxyles du glycérol sont estérifiés par des acides en C_{16} et C_{18} et le troisième hydroxyle par un acide en C_{37}, C_{39} ou C_{41} .

Les pics de fragmentation du spectre de masse du triglycéride naturel sont moins intenses que dans le cas du composé hydrogéné. Cependant on retrouve les pics qui correspondent aux ions (RCO), (RCO + 74), (RCO + 128), (RCO + 128 + 14 n) et (M - RCOO). Ces pics ont des valeurs inférieures de 6 ou 8 unités de masse par rapport au composé hydrogéné quand ils correspondent aux acides en C_{37}, C_{39} et C_{41} tri et tétra-insaturés.

EVOLUTION DE LA COMPOSITION LIPIDIQUE

AU COURS DE LA CROISSANCE

L'étude structurale des lipides de Nocardia asteroides a montré qu'ils étaient constitués d'un mélange d'acides gras non hydroxylés de moyen poids moléculaire, d'acides nocardiques, de nocardols et de nocardones. Ces trois derniers composés représentent un ensemble de composés à haut poids moléculaire, leur biogénèse s'effectue à partir d'acides gras en C_{14} , C_{16} et C_{18} (57)(58).

Dans les lipides de N. kirovani nous avons également mis en évidence des acides gras de poids moléculaire moyen, des acides nocardiques, des nocardols et des nocardones. Les acides nocardiques, nocardols et nocardones sont des composés tri et tétraéthyléniques qui ont de 57 à 66 atomes de carbone, ils présentent une analogie structurale évidente qui doit correspondre à une origine biogénétique commune démontrée dans le cas de N. asteroides.

Le rôle de ces composés à haut poids moléculaire dans la cellule bactérienne est encore mal connu. Il est possible que leur biosynthèse ne soit pas constante au cours de la croissance bactérienne. Nous avons donc étudié la variation de la composition lipidique après différents temps de culture de N. asteroides 9969 (108).

Pour cette étude, N. asteroides est cultivé en fermenteur avec agitation et aération continues du milieu. On utilise le milieu de Sauton auquel on additionne de l'acétate de sodium ^{14}C 1. L'acétate est incorporé dans les lipides bactériens ce qui permet de déterminer le taux de chacun des composés lipidiques. Des prélèvements sont effectués à des intervalles de temps réguliers et, après élimination du milieu de culture, les bactéries sont extraites par le mélange chloroforme-méthanol (2:1). La solution lipidique est lavée selon Folch (109) pour éliminer les composés hydrosolubles. Les lipides totaux ainsi obtenus sont saponifiés par la potasse ; les différents composés : acides gras non hydroxylés, acides nocardiques, nocardols et nocardones sont séparés par chromatographie sur couches minces de gel de silice et la radioactivité de chacun est mesurée. On détermine ainsi le pourcentage des différents constituants pour chaque prélèvement.

Courbe de croissance.

Les *Nocardia* cultivés en fermenteur avec aération et agitation ont un aspect très différent des *Nocardia* provenant de cultures en surface ; ils n'ont pas une structure filamenteuse et ils se présentent sous la forme de petits grains sédimentant facilement.

La courbe de croissance est déterminée par pesée des bactéries de chaque prélèvement,; elle est représentée figure 11 (courbe A), elle indique une phase exponentielle de 12 jours suivie d'une phase stationnaire.

La quantité des lipides totaux, (courbe B), déterminée par mesure de la radioactivité, augmente fortement au cours de la phase exponentielle et demeure constante pendant la phase stationnaire, au voisinage de 20 % du poids sec des bactéries.

Variations des différents lipides.

Les variations des différents types de lipides, acides gras non hydroxylés, acides nocardiques, nocardols et nocardones sont représentés figure 12. Le pourcentage d'acides gras de poids moléculaire moyen non hydroxylés diminue régulièrement : il passe de 64 % des lipides totaux après 4 jours de culture à 44 % au bout de 32 jours (courbe A). Pendant toute la durée de la croissance, ces acides gras constituent la fraction lipidique la plus importante. Le taux d'acides nocardiques qui augmente légèrement pendant la période de croissance exponentielle, présente une augmentation plus importante au cours de la phase stationnaire, passant de 16 % au bout de 12 jours à 34 % après 32 jours de culture (courbe B). Par contre les nocardols (courbe C) et les nocardones (courbe D) restent sensiblement constants : 20 % pour les nocardols et 5 % pour les nocardones pendant toute la durée de la culture.

L'incorporation d'acétate s'effectue rapidement dès les premiers jours de la culture et ce sont essentiellement les acides gras de poids moléculaire moyen non hydroxylés qui possèdent la majeure partie de la radioactivité. Le pourcentage des lipides totaux augmente au cours de la phase exponentielle, passant de 6 % au quatrième jour à 22 % au douzième jour pour rester ensuite stationnaire.

Les dosages de phosphore effectués suivant la méthode de Lowry et coll (110) sur les extraits lipidiques des différents prélèvements indiquent un taux de phosphore constant. La proportion de phospholipides reste donc uniforme au cours de la culture, il est vraisemblable qu'il n'y a pas de modification dans la composition de la membrane cytoplasmique.

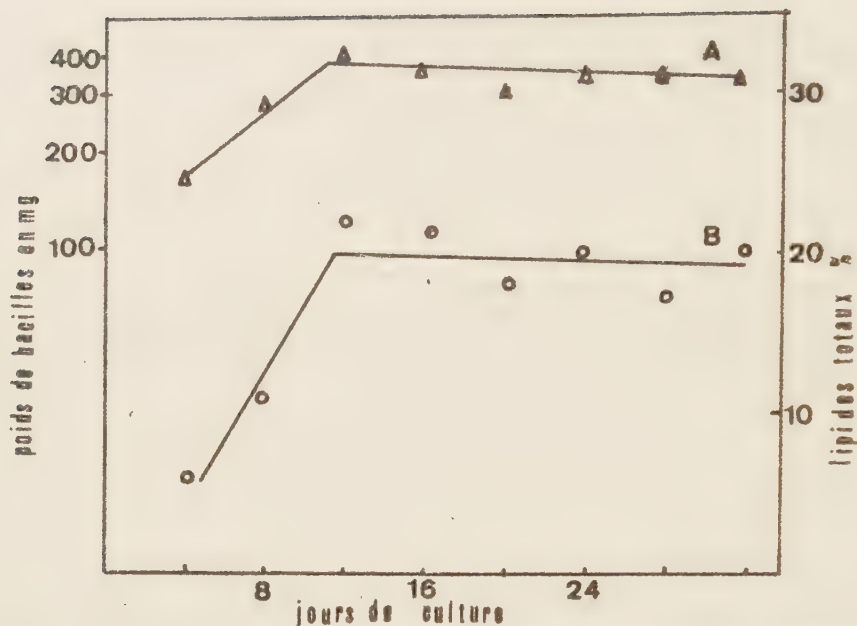


Figure 11 . A - Courbe de croissance de Nocardia asteroides.
B - Lipides totaux exprimés en % du poids de bacilles.



Figure 12 . Variation des différents lipides au cours de la culture, les quantités de chaque composé sont exprimées en % des lipides totaux. A - Acides gras non hydroxylés - B - Acides nocardiques - C - Nocardols - D - Nocardones.

Nous avons montré que les acides nocardiques étaient essentiellement localisés dans les parois des *Nocardia* (voir deuxième partie). Une modification de la composition lipidique des parois peut donc être observée pendant la période de repos correspondant par ailleurs à un ralentissement ou à un arrêt de la plupart des activités métaboliques de la bactérie.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. METHODES GENERALES

A. Cultures et extractions

Les bacilles ont été cultivés pendant une semaine sur milieu de Sauton (111) en boîtes de Roux. Ils sont séparés du milieu de culture par centrifugation et lavés 2 fois à l'eau distillée. On obtient 180 g de bactéries humides à partir de 5 litres de milieu de culture répartis dans 25 boîtes de Roux.

Les lipides bactériens sont extraits par le mélange alcool-éther (1:1), avec agitation, à température ambiante pendant 12 heures. Après 3 extractions successives les bacilles gardent une teinte saumon. L'extrait éthéro-alcoolique est ensuite repris par l'éther et l'eau pour éliminer les composés hydrosolubles, on obtient 1,6 g d'extrait éthéré. Le résidu bactérien est traité par le chloroforme, ce solvant extrait le pigment caroténoïdique, puis par le mélange chloroforme-méthanol-eau (1:1:0,1) à chaud sous reflux. L'extrait est repris par le mélange chloroforme-eau, ce qui donne 1,5 g de substance soluble dans le chloroforme.

B. Séparations chromatographiques.

1. Chromatographies sur colonne.

L'adsorbant utilisé est l'acide silicique Mallinckrodt (100 mesh) employé seul ou en mélange avec la célite 545 dans les proportions (2:1). Il est activé par chauffage à 120° pendant 16 heures. Les solvants éluants sont :

- l'hexane distillé et séché sur sulfate de sodium,
- l'éther distillé en présence de sulfate ferreux pour détruire les peroxydes et séché sur sulfate de sodium,

- le chloroforme distillé et séché sur sulfate de sodium,
- l'acétone distillée,
- le méthanol distillé sur sodium.

2. Chromatographies en couches minces.

Les plaques de 0,3 mm d'épaisseur et de 100 x 200 mm ou 200 x 200 mm sont préparées avec l'appareil Desaga, en utilisant le gel de silice G Merck. Elles sont activées 1 heure à 120°.

3. Chromatographies en phase gazeuse.

Elles sont effectuées avec un appareil Chromagas CG 2 muni d'un détecteur à ionisation de flamme. Les colonnes ont une longueur moyenne de 1,50 mètre et un diamètre intérieur de 6,25 mm. Les phases stationnaires sont :

- Diéthylène glycol succinate (D.E.G.S.) à 10 % sur Anackrom 80-100 mesh, à une température de 180°,
- Apiezon L sur fire-brick 60-80 mesh à 210°.

Le pourcentage de chaque ester a été calculé d'après l'aire du pic correspondant (112).

4. Chromatographies sur papier.

Le glycérol est mis en évidence après hydrolyse des triglycérides par chromatographie descendante sur papier Whatman n°1.

C. Spectrométrie de masse.

Les spectres de masse des composés lipidiques ont été effectués sur un appareil MS 902 (AEI) avec introduction directe de l'échantillon, au laboratoire de Chimie Analytique pharmaceutique de l'Université de Lyon I*.

* Nous remercions Monsieur R. Guilluy et Monsieur D. Deruaz qui ont effectué les spectres dans le laboratoire de Monsieur le Professeur A. Badinand.

D. Spectrométrie dans l'infra-rouge et l'ultra-violet et spectrométrie de R.M.N.

Les spectres infra-rouges ont été enregistrés sur un appareil Perkin-Elmer. L'échantillon est mis en solution dans le nujol entre deux pastilles de chlorure de sodium.

Les spectres ultra-violet ont été effectués sur un appareil Perkin-Elmer (modèle DB).

Le spectre de R.M.N. des esters méthyliques à haut poids moléculaire a été enregistré dans le laboratoire de Spectroscopie Hertzienne de l'Université de Lyon I (Professeur J. Delmau), sur un appareil Varian A 60.

II. TECHNIQUES APPLIQUEES A L'ETUDE DES CAROTENOÏDES

A. Préparation et séparations chromatographiques.

Ils sont séparés des contaminants lipidiques par chromatographie sur colonne ou par chromatographies en couches minces préparatives.

1. Chromatographie sur colonne.

L'adsorbant utilisé est l'acide silicique Mallinckrodt en mélange avec la célite 545. L'élution est réalisée par l'hexane contenant des proportions croissantes d'éther. Les caroténoïdes glucosidiques sont élués par le solvant hexane-éther (1:3). Pour éviter l'altération des pigments par la lumière durant la chromatographie, la colonne est entourée de papier noir et l'expérience doit s'effectuer dans un minimum de temps. Les différentes fractions colorées, après leur élution, sont maintenues à 0°.

2. Chromatographies en couches minces.

Les différentes fractions éluées de la colonne sont étudiées par chromatographie en couches minces de gel de silice. Les plaques sont développées à l'obscurité dans le solvant chloroforme-méthanol (19:1).

- Chromatographies préparatives. On utilise des plaques de 200 x 200 mm. Après migration du solvant, le gel de silice coloré correspondant au pigment pur est recueilli, le composé est immédiatement extrait par l'éther ou l'acétone.

- Chromatographies des sucres. On utilise la technique de Lato et coll. (76). Le gel de silice est mélangé avec une solution 0,2 M de NaH_2PO_4 .

jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène et les plaques sont faites de la manière habituelle. Elles sont séchées 24 heures à température ordinaire et activées 1 heure à 110°. Le développement s'effectue dans le solvant n-butanol-acétone-eau (4:5:1) en présence d'oses témoins. Les sucres sont révélés en vaporisant une solution fraîchement préparée de naphtorésorcinol : ils apparaissent en bleu sur un fond blanc, ou de chlorure de triphényltétrazolium (113) : ils donnent des taches rouges sur un fond rosé. La sensibilité de cette méthode est de 5 ng de sucre.

3. Chromatographies circulaires sur papier enrichi en adsorbant minéral.

Cette technique a été appliquée aux caroténoïdes par Jensen et Liaaen-Jensen (72). On utilise les disques de papier Schleicher et Schüll n° 287 contenant 20 % de Kieselguhr en chromatographie circulaire. Le solvant employé est l'hexane ou le benzène renfermant 5, 15 ou 30 % d'acétone suivant la polarité plus ou moins forte des caroténoïdes à séparer. Le développement s'effectue en 15 - 20 minutes, à l'abri de la lumière.

Pour les chromatographies préparatives, les bandes colorées sont découpées immédiatement après séparation, tassées au fond de tubes de verre effilés à une extrémité et éluées par l'acétone. On obtient ainsi d'excellents rendements. (114)

B. Déterminations spectrophotométriques.

Les spectres mesurés dans le visible ont été effectués sur un spectrophotomètre Beckman. Les solvants employés sont l'acétone ou l'hexane distillés. La densité optique au maximum d'absorption sert à calculer la quantité de caroténoïde présent dans la préparation, en utilisant le coefficient d'extinction spécifique. Pour la phlei-xanthophylle isolée de M. phlei la valeur de $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ est égale à 1740 (66). Cette valeur a été utilisée pour déterminer les quantités de pigments préparés à partir des lipides de N. kirovani.

Le rendement en caroténoïdes glucosidiques est environ 0,05 % du poids sec des bacilles, c'est-à-dire qu'à partir de 40 g de bacilles secs on obtient 8 mg de caroténoïdes.

Les quantités de composés utilisés pour les réactions sont déterminées spectrophotométriquement.

C. Acétylation.

L'acétylation est effectuée sous atmosphère d'azote, à l'obscurité et à température ambiante : à 0,1 mg de xanthophylle on ajoute 0,1 ml d'anhydride acétique et 0,3 ml de pyridine anhydre. Au temps initial et après des temps de réaction de 15 min., 30 min., 1 h 30, 2 h 30, 7 h et 24 h, une partie aliquôte est prélevée, déposée au centre d'un disque de papier Schleicher et Schüll n° 287 et chromatographiée dans le solvant hexane-acétone (85:15). L'acétylation est arrêtée au bout de 24 heures et l'acétate final est extrait à l'éther.

D. Saponification.

0,3 mg de pigment sont dissous dans 2 ml du mélange benzène-méthanol (1:1), on ajoute 2 ml de potasse méthanolique à 5 % et on laisse sous atmosphère d'azote, à l'obscurité, à température ordinaire pendant 2 heures. La fin de la saponification est vérifiée par chromatographie en couches minces de gel de silice dans le solvant chloroforme-méthanol (95:5) : le pigment saponifié ne migre pas dans ce solvant. Le milieu réactionnel est repris par l'éther et l'eau ; le caroténoïde se dissout dans la phase organique et les acides gras sous forme de sels de potassium sont extraits par l'eau. Ils sont récupérés après acidification de la solution aqueuse et extraction par l'éther.

E. Hydrolyse par le chloroforme chlorhydrique (75).

La réaction est effectuée sur les phlei-xanthophylles isolées de N. kirovani et M. phlei avant et après saponification.

On fait barboter l'acide chlorhydrique gazeux dans le chloroforme distillé et séché sur Na_2SO_4 . La solution chloroformique est titrée par une solution de soude.

0,3 mg de pigment sont dissous dans 1,1 ml de CHCl_3 , on ajoute 0,2 ml de $\text{CHCl}_3\text{-HCl}$ 0,13 N. On laisse 10 minutes à température ordinaire, on remarque un changement de la coloration qui devient plus foncée. On ajoute de l'eau, le caroténoïde est extrait par le chloroforme, ce dernier est lavé à l'eau jusqu'à neutralité et séché sur Na_2SO_4 . Le produit de la réaction est testé par chromatographie sur papier dans le solvant hexane-acétone (97:3) et le composé principal est purifié par chromatographie préparative.

F. Oxydation par le parachloranile (77).

La réaction est effectuée sur 50 µg de pigment. On utilise : 0,25 ml de benzène, 0,1 ml d'éthanol absolu, 150 µg de parachloranile (0,25 ml d'une solution à 0,06 % dans le benzène), 0,025 ml d'une solution d'iode à 0,006 % dans l'hexane.

Le milieu est maintenu sous atmosphère d'azote et éclairé par une lampe de 60 watts située à 60 cm. Le composé cétonique est mis en évidence par chromatographie sur papier. Après 20 heures de réaction, le rendement obtenu est de 90 %.

La réaction est effectuée sur le caroténoïde isolé de N. kirovani avant et après saponification et sur la phlei-xanthophylle de M. phlei utilisée comme composé de référence.

III. TECHNIQUES APPLIQUEES A L'ETUDE DES LIPIDES

A. Chromatographies sur colonne.

1. L'extrait éthéré est chromatographié sur une colonne d'acide silicique préparé selon Exterkate et coll (79). L'acide silicique est purifié par lavages successifs à l'hexane, chloroforme, méthanol et acétone puis séché à 120° pendant 16 heures. On utilise 1 g d'acide silicique purifié pour 10 mg de lipides ; 1,5 g d'extrait éthéré sont chromatographiés sur 150 g d'acide silicique. L'élution se fait par fractions de 200 ml.

Chromatographie n°1

<u>Fraction</u>	<u>Solvant</u>	<u>Poids (mg)</u>
1	Chloroforme	102
2	"	390
3	"	295
4	"	82
5	"	78
6	"	77
7	"	13
8	"	6
9	"	23
10	"	10
11	"	8

12	Acétone	8
13	"	262
14	"	17
15	"	17
16	Méthanol	6
17	Méthanol-CHCl ₃ -eau (10:10:0,1)	23
18	"	6
19	"	34

Total : 1457 mg

Les fractions 1 à 11 éluées au chloroforme sont constituées par les lipides neutres, elles représentent 72 % des lipides totaux. Les fractions 12 à 15 renferment un mélange complexe de glycolipides mis en évidence par chromatographie en couches minces dans le solvant chloroforme-méthanol (9:1) et révélation par les vapeurs d'iode. Les dernières fractions sont constituées par les phospholipides.

2. Extrait chloroformique.

1,035 g de produit sont chromatographiés sur 75 g du mélange acide silicique-célite (2:1). L'éluat est recueilli par fractions de 200 ml.

Chromatographie n°2

<u>Fraction</u>	<u>Solvant</u>	<u>Poids (mg)</u>
1	Chloroforme	348
2	"	42
3	"	20
4	"	3
5	Chloroforme-méthanol (99:1)	1
6	"	2
7	" (98:2)	12
8	"	48
9	"	11
10	" (95:5)	40
11	"	37
12	"	13
13	" (90:10)	9
14	"	23
15	" (80:20)	25
16	"	57
17	" (1:1)	173
18	"	61

19	Chloroforme-méthanol-eau (1:1:0,1)	31
20	"	7
Total :		973 mg

Les fractions 1 à 4 sont constituées du mélange de triglycérides qui représente 40 % de l'extrait chloroformique. Les autres fractions quantitativement importantes (fractions 8, 11 et 17) renferment essentiellement les phospholipides, la cardiolipine et des phosphatidylinositomannosides étant les représentants majeurs.

B. Préparation des acides.

Acides gras libres.

Les fractions 1 à 11 de la chromatographie n°1 sont analysées par chromatographie en couches minces dans le solvant hexane-éther (9:1). Les composés lipidiques sont révélés par vaporisation d'une solution de rhodamine B à 0,01 % dans le phosphate monosodique 0,25 M et de 2'7'-dichlorofluoresceine à 2 % dans alcool-eau (1:1) et examen sous lumière ultra-violette. Les fractions 3 à 11 constituées exclusivement d'acides gras libres sont rassemblées. Les acides gras sont méthylés par le diazométhane obtenu par action de la potasse sur la nitrosométhylurée en milieu étheré (115). Les esters méthyliques des acides gras hydroxylés et des acides gras non hydroxylés sont séparés par chromatographie en couches minces préparative dans le solvant hexane-éther (4:1). Après révélation, chaque bande est recueillie et les composés sont élués du gel de silice par l'éther anhydre.

Les esters méthyliques des acides gras non hydroxylés sont étudiés par chromatographie gaz-liquide et les esters hydroxylés, c'est-à-dire les esters nocardiques sont soumis à la spectrométrie de masse.

Acides gras à haut poids moléculaire.

Ils sont obtenus par hydrolyse ou saponification des glycérides. Après méthylation, ils sont séparés des acides gras de poids moléculaire plus faible par chromatographie en couches minces dans le solvant hexane-éther (4:1).

Hydrogénation.

Elle est effectuée sur les nocardates de méthyle et sur les esters à haut poids moléculaire.

10 mg d'esters dissous dans 1 ml d'acétate d'éthyle distillé sont ajoutés à 10 mg d'oxyde de platine préhydrogéné. L'ensemble est agité en présence d'hydrogène pendant 2 heures. Le produit hydrogéné est débarrassé de l'oxyde de platine par filtration à chaud sur une petite colonne d'alumine.

C. Préparation des alcools et des cétones.

La deuxième fraction de la chromatographie n°1 est saponifiée par la potasse méthanolique à 10 % sous reflux et sous atmosphère d'azote pendant 7 heures. Après évaporation des solvants et acidification par HCl, les composés lipidiques sont extraits à l'éther, celui-ci est repris par NaOH à 1 %. La phase aqueuse est acidifiée et les acides extraits à l'éther. La phase organique, lavée à l'eau distillée et séchée sur sulfate de sodium, fournit 12 % de partie insaponifiable. Chromatographiée sur plaque de gel de silice dans le solvant hexane-éther (96:4), elle donne 2 taches de Rf respectifs 0,50 et 0,22 ; chaque composé est isolé par chromatographie préparative.

Le spectre infra-rouge du composé de Rf 0,50 (60 %) présente les bandes caractéristiques de la fonction cétone et celui du composé de Rf = 0,22 (40 %) les bandes caractéristiques de la fonction alcool. Un échantillon de chaque composé est soumis à la spectrométrie de masse.

D. Préparation des triglycérides.

Ils ont été obtenus : - à partir de l'extrait éthéré : ce sont les principaux constituants de la première fraction de la chromatographie n°1.
- à partir des fractions 1 à 4 de la chromatographie n°2.

Les glycérides, analysés par chromatographie en couches minces dans le solvant hexane-éther (4:1), donnent 2 taches de Rf voisins 0,71 et 0,78. Les composés correspondants ont été obtenus par chromatographie en couches minces préparative.

E. Réduction des esters à haut poids moléculaire en hydrocarbures.

30 mg d'esters séchés sous vide en présence de P_2O_5 sont dissous dans 1 ml de tétrahydrofurane anhydre. On ajoute 1 ml d'une solution de $LiAlH_4$ M. Le tétrahydrofurane anhydre et la solution de $LiAlH_4$ sont

préparés selon la méthode de Crawhall et Elliot (102).

Le mélange maintenu en atmosphère anhydre est agité pendant 3 heures à température ordinaire. On détruit l'excès de LiAlH_4 en acidifiant le milieu par addition de H_2SO_4 dilué. Les solvants sont évaporés et les alcools extraits à l'éther. Ils sont transformés en composés iodés par chauffage à 100° pendant 90 minutes en présence de 60 mg d'iode et de 12 mg de phosphore rouge (103). Les produits obtenus, extraits à l'éther, sont à nouveau réduits par une solution de LiAlH_4 dans le tétrahydrofurane.

Les hydrocarbures sont purifiés par chromatographie sur colonne d'alumine Woelm (activité I) et élution par l'hexane. On récupère 10 mg du mélange d'hydrocarbures.

F. Oxydation chromique (80)(105)

10 mg d'esters sont ajoutés à une solution de 150 mg de CrO_3 dans 0,6 ml d'acide acétique et 0,3 ml d'anhydride acétique. Le mélange est placé pendant une nuit à 0° , puis on ajoute 12 ml d'eau et l'excès de CrO_3 est détruit par le bisulfite de sodium. L'ensemble est chauffé et 12 ml de distillat sont recueillis dans une solution chlorhydrique de 2,4-dinitrophénylhydrazine. Les hydrazones sont extraites à l'hexane et identifiées par chromatographie en couches minces dans le solvant hexane-éther-alcool (88:10:2) en présence d'hydrazones témoins (106).

IV. TECHNIQUES APPLIQUEES AUX CULTURES RADIOACTIVES

A. Obtention des bactéries.

La culture est effectuée dans un fermenteur New Brunswick Scientific Co, Inc, à partir de 10 litres de milieu de Sauton auxquels on ajoute 0,5 mCi d'acétate de sodium ^{14}C 1 d'activité spécifique 10 mCi/m mole. Le milieu de culture est aéré par un courant d'air stérile et agité à 200 tours/minute. Un prélèvement de 500 ml est effectué tous les 4 jours, les bactéries sont centrifugées et le culot de centrifugation est lavé 2 fois par une solution de K_2HPO_4 - MgSO_4 à 0,5 g/l. Le dernier liquide de lavage ne renferme plus de radioactivité.

B. Fractionnement des lipides.

Le résidu bactérien est extrait 2 fois par le mélange chloroforme-méthanol(2:1) sous agitation magnétique pendant 12 heures à température ambiante. On utilise 50 ml de solvant par gramme de bactéries. Après

élimination des bacilles, les solvants sont évaporés et les composés hydrosolubles sont éliminés par lavage selon la méthode de Folch et coll. (109). Les lipides sont saponifiés par une solution méthanolique de potasse à 5 % et la fraction éthérosoluble est recueillie après acidification de la solution. Les produits de saponification sont séparés par chromatographie en couches minces sur plaques de gel de silice G avec le solvant hexane-éther (19:1). Les lipides sont révélés par pulvérisation d'une solution de rhodamine et fluoresceine. L'emplacement des composés radioactifs est indiqué par autoradiographie : des films Kodirex sont placés sur la plaque pendant une nuit. Les taches apparaissant à la rhodamine-fluoresceine coïncident avec celles de l'autoradiogramme ; trois groupes de composés sont ainsi obtenus correspondant aux nocardones, nocardols et acides gras. La fraction lipidique acide de R_f 0,5 est reprise, éluée du gel de silice et estérifiée par le diazométhane. Une nouvelle chromatographie sur couches minces dans le solvant hexane-éther (75:25) permet de séparer les esters des acides gras non hydroxylés des esters nocardiques.

C. Mesure de la radioactivité.

Chaque groupe de lipides est élué du gel de silice par l'éther. Après évaporation du solvant, la radioactivité du résidu est mesurée avec un passeur automatique à très faible mouvement propre Biospan 4342, Nuclear Magnetic Chicago.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DES CONSTITUANTS DES PAROIS

PREPARATION DES PAROIS DE N. KIROVANI (116)

Les parois sont préparées par désintégration ultrasonique des bactéries à 0°. Une première centrifugation à 1700 g permet d'éliminer les bacilles intacts qui sont soumis à une nouvelle sonication, les parois sont ensuite obtenues par centrifugation à 40.000 g. Elles sont traitées à l'urée et à la trypsine pour éliminer les protéines (30)(117) : on obtient les parois brutes P_A qui présentent une coloration saumon. 100 g de bacilles humides donnent 2,5 g de parois brutes. Ces parois sont délipidées par extractions répétées avec le mélange alcool-éther (1:1), chloroforme et chloroforme-méthanol (1:1) à température ordinaire, chacun des solvants extrait respectivement 15,6 %, 1,3 % et 0,6 % de lipides. Le produit restant, lyophilisé, constitue les parois délipidées P_B qui représentent 82 % du produit initial. Les parois P_B sont traitées par la potasse alcoolique à 0,5 % pendant 48 heures à 37° (117), la solution alcoolique extrait 23 % des parois P_B représentant les lipides liés, le résidu constitue les parois pures P_C . Les parois ainsi obtenues renferment encore une grande quantité de polysides, elles ne sont pas sensibles à l'enzyme de Myxobacter (6). Pour les sensibiliser il est nécessaire d'effectuer un traitement par l'acide chlorhydrique 0,1 N à 60° pendant 12 heures (19), cette hydrolyse douce élimine une partie polysaccharidique.

La pureté des préparations est vérifiée par examen au microscope électronique après ombrage au platine irridié *. Les parois présentent l'aspect caractéristique de sacs vides plus ou moins déchiquetés avec une surface granuleuse pour les parois brutes et plus lisse pour les parois délipidées.

* L'examen au microscope électronique a été effectué au laboratoire de Bactériologie de l'Université de Liège, 32 bd de la Constitution, Liège, Belgique.

ETUDE DES LIPIDES DES PAROIS

La présence de lipides dans les parois a été mise en évidence dès 1952 par Salton (118). Ils sont généralement plus abondants dans les bactéries gram négatives que dans les bactéries gram-positives, cependant les parois de Mycobacterium B.C.G. (49) et de Corynebacterium diphteriae (119) sont particulièrement riches en fraction lipidique.

Les Nocardia renferment une proportion élevée de lipides (59) constitués en majorité par des composés de poids moléculaire élevé, acides ou esters nocardiques alors que les phospholipides existent en quantité beaucoup plus faible. Une partie importante des lipides doit être localisée dans les parois, il est en effet nécessaire de traiter les parois de N. kirovani par des solvants organiques pour qu'elles deviennent sensibles aux enzymes lytiques. Une partie des lipides est extraite directement par les solvants organiques, une autre partie, liée aux parois, n'est extraite qu'après saponification ménagée.

I. Etude des lipides libres.

Les extraits lipidiques sont étudiés par chromatographie en couches minces, en utilisant comme témoins les lipides isolés à partir des bacilles totaux. Ils renferment essentiellement quatre séries de composés :

- un pigment rouge-orangé,
- un composé cétonique peu retenu sur plaques de gel de silice,
- des esters situés au niveau des triglycérides,
- des acides gras libres.

Le pigment colore les parois P_A en rose saumon, il est extrait par le solvant alcool-éther (1:1). Le spectre visible de la solution éthéro-alcoolique est identique à celui du caroténoïde glucosidique isolé de l'extrait chloroformique des bacilles totaux. Par chromatographie circulaire sur papier imprégné de Kieselguhr (72) dans le solvant benzène-acétone (70:30) il s'identifie au monoester de la phlei-xanthophylle. Ainsi le pigment de N. kirovani se trouve localisé dans la paroi.

Les composés cétoniques sont obtenus par chromatographie en couches minces de gel de silice et représentent 10 % de l'extrait éthéro-alcoolique. Le spectre de masse est analogue en tous points à celui des

nocardones isolées à partir des lipides totaux.

Il s'agit de cétones tri et tétraéthyléniques ayant de 57 à 63 atomes de carbone.

Les esters sont représentés par les triglycérides A et B étudiés dans la première partie de ce travail, ils se retrouvent en faible proportion (environ 5 %) dans l'extrait éthéro-alcoolique des parois et dans l'extrait chloroforme-méthanol (1:1) dont ils constituent la majeure partie. Ils sont identifiés par chromatographie en couches minces en utilisant comme témoin les triglycérides isolés des lipides totaux.

Le composé A est un mélange de triglycérides mixtes qui contiennent les acides linéaires en C₁₄, C₁₆, C₁₈ et C_{18:1}. Le composé B est un mélange de triglycérides mixtes qui renferment à côté de ces acides des acides de poids moléculaires plus élevés en C₃₇, C₃₉ et C₄₁.

Les acides constituent la partie essentielle de l'extrait éthéro-alcoolique des parois. Après méthylation, les esters des acides gras hydroxylés sont séparés des esters non hydroxylés. Ils représentent respectivement 60 et 40 % du mélange des esters. Les esters non hydroxylés sont étudiés par chromatographie gaz-liquide et sont identifiés au palmitate de méthyle accompagné en plus faible quantité de stéarate et d'oléate de méthyle.

Les esters hydroxylés étudiés par spectrométrie de masse sont identiques aux esters nocardiques isolés à partir des cellules entières. Ils sont tri et tétraéthyléniques avec 59 à 67 atomes de carbone, les doubles liaisons sont localisées sur la chaîne principale, la chaîne latérale est saturée et renferme 14 atomes de carbone.

II. Etude des composés lipidiques libérés par le traitement alcalin.

Les parois délipidées P_A sont soumises à une saponification douce par la potasse méthanolique à 0,5 % pendant 48 heures à 37°. Après élimination des parois par centrifugation, lavage à l'alcool et à l'éther, les solutions organiques sont rassemblées et acidifiées, les solvants sont évaporés et le résidu repris par l'eau et l'éther. La solution éthérée renferme des acides nocardiques. Leur spectre de masse indique qu'ils sont tri et tétraéthyléniques et possèdent de 58 à 66 atomes de carbone ; ils sont analogues aux acides isolés à partir des lipides libres.

Ionedá et coll. (85) ont montré que dans une souche de N. asteroides les acides nocardiques font partie de la paroi ; ils sont obtenus après saponification du résidu bacillaire préalablement extrait par le mélange alcool-éther et par le chloroforme, ce sont des acides saturés, mono, di et tri-insaturés qui renferment de 50 à 58 atomes de carbone. Dans cette même souche les acides hydroxylés des lipides libres appartiennent à une série différente, ils possèdent de 28 à 36 atomes de carbone et 2 insaturations dont l'une est située dans la chaîne latérale.

Dans le cas de N. kirovani les acides nocardiques isolés à partir des lipides bacillaires, des lipides pariétaux libres et des lipides pariétaux liés sont identiques.

Les acides nocardiques libérés par saponification des parois de N. kirovani doivent vraisemblablement estérifier un arabinogalactane, la présence d'arabinose et de galactose a été effectivement décelée dans les parois de N. kirovani et Lanée et Asselineau (84) ont isolé des nocardates d'arabinose à partir des lipides liés de N. brasiliensis.

ETUDE DU PEPTIDOGLYCANE

I. COMPOSITION DU PEPTIDOGLYCANE

Le peptidoglycane forme l'ossature de la paroi, c'est un polymère commun à toutes les bactéries. Il est formé de chaînes polyosidiques de deux sucres aminés régulièrement alternés, sur l'un des deux sucres sont fixés des peptides reliés entre eux par des liaisons interpeptidiques, l'ensemble forme un réseau tridimensionnel.

A. Dosage des constituants.

Les différents lots de parois sont hydrolysés par l'acide chlorhydrique. L'hydrolyse est effectuée par HCl 6N pendant 16 heures à 110° pour l'analyse des acides aminés et par HCl 3N pendant 3 heures à 100° pour celle des hexosamines. Les aminoacides sont identifiés et dosés par la méthode de Moore et Stein à l'autoanalyseur "Technicon", ce sont l'acide diaminopimélique, l'acide glutamique et l'alanine. Il faut noter également la présence de traces d'acide aspartique, thréonine, sérine, glycocolle et valine qui représentent moins de 6 % des acides aminés totaux dans les parois purifiées.

Les osamines sont identifiées par chromatographie sur papier dans le solvant butanol-acide acétique-eau (5:1:2) à la glucosamine ($R_f = 0,14$) et à l'acide muramique ($R_f = 0,33$), elles sont dosées par la méthode de Morgan-Elson (120). Les résultats des dosages des acides aminés et des hexosamines ainsi que les rapports molaires sont indiqués dans le tableau XI.

TABLEAU XI

Composition des parois en acides aminés et hexosamines à différents stades de purification.

	P _A	P _B	P _C	P _D
nmoles/mg	323	400	459	802
DAP				
rapport molaire	1	1	1	1
nmoles/mg	377	483	537	918
Glu				
rapport molaire	1,17	1,2	1,17	1,14
nmoles/mg	530	660	771	1302
Ala				
rapport molaire	1,64	1,65	1,68	1,62
nmoles/mg	585	695	815	1550
Hexosamines				
rapport molaire	1,82	1,72	1,76	1,92

Les rapports molaires sont exprimés avec DAP comme référence

Les parois renferment également du phosphore et des sucres neutres identifiés par chromatographie sur papier à l'arabinose et au galactose dans un rapport voisin de (2:1). Le dosage de ces différents composés a donné les résultats indiqués dans le tableau XII.

TABLEAU XII

Dosage des sucres et du phosphore dans les parois à différents stades de purification.

	<u>% sucres neutres</u>	<u>% phosphore</u>
P _A	23	0,25
P _B	28	0,3
P _C	35	0,3
P _D	2	0,4

B. Configuration optique des acides aminés.

1. Acide diaminopimélique.

La présence de meso-DAP dans différentes souches de *Nocardia* (*N.asteroides*, *N.leishmanii*, *N.corallina*, *N.rubra*, *N.coeliaca*, *N.maduræ* et *N.lutea*) a été déterminée dès 1957 par Hoare et Work (12). Becker et coll. (45) utilisent la configuration optique du DAP présent dans les parois pour différencier les genres *Nocardia* et *Streptomyces*. Les *Nocardia* renferment du meso-DAP tandis que les *Streptomyces* ont le dérivé LL.

Nous avons déterminé la configuration optique du DAP des parois de *N.kirovani* par chromatographie sur papier selon la technique employée par Bricas et coll. (13) pour la recherche des isomères du DAP dans les parois de *Bacillus megaterium*. Une première chromatographie d'un hydrolysât de parois est effectuée dans le système de solvants : méthanol-pyridine-HCl 10 N-H₂O (80:10:2,5:17,5) (121), dans ce solvant, l'isomère LL migre plus rapidement que les isomères meso et DD qui ne sont pas séparés $R_{LL-DAP} = 0,86$; on constate que les parois de *N.kirovani* ne renferment pas d'isomère LL.

Les acides aminés de l'hydrolysât des parois sont ensuite dinitrophénylés ; les DNP dérivés sont chromatographiés sur papier Whatman n°3 imprégné de tampon phtalate 0,1 M pH 6, le solvant est l'alcool amylique tertiaire saturé de tampon phtalate (122). Le di-DNP dérivé de l'acide

diaminopimélique des parois possède le même Rf que le di-DNP dérivé du meso-DAP (Rf = 0,60 par rapport à di-DNP-DD-DAP).

2. Alanine.

La configuration optique de l'alanine a été déterminée par action de la D-aminoacide oxydase dans un tampon pyrophosphate 0,1 M pH 8,3 en présence de FAD (123). La réaction est effectuée dans les mêmes conditions sur un hydrolysât des parois P_C et sur des solutions témoins de D et de L-alanine. Après action de l'enzyme, la diminution de l'alanine déterminée par le dosage des acides aminés résiduels en utilisant la méthode des DNP dérivés est de 46 %. Ainsi la moitié de l'alanine possède la configuration D, l'autre moitié a la configuration L.

3. Acide glutamique.

La D-aminoacide oxydase n'agit pas sur l'acide D-glutamique (124). Nous avons utilisé l'action de la L-acide glutamique décarboxylase. La réaction est effectuée sur un hydrolysât de parois et sur des solutions témoins d'acide D et L-glutamique dans un tampon acétate 0,2 M pH 4,5 (125). L'acide glutamique est dosé colorimétriquement après formation du DNP dérivé. L'action de l'enzyme est totale sur la solution témoin d'acide L-glutamique, nulle sur la solution d'acide D-glutamique et sur l'hydrolysât de parois. L'acide glutamique présent dans le peptidoglycane a donc la configuration D.

II. DEGRADATION DU PEPTIDOGLYCANE

Deux enzymes ont été utilisés pour hydrolyser spécifiquement le peptidoglycane : le lysozyme et l'enzyme AL 1 de Myxobacter.

Le lysozyme est une endo-N-acétylmuramidase qui coupe les liaisons osidiques entre l'acide muramique et la glucosamine. Il donne des disaccharides peptides ayant des degrés de polymérisation différents selon qu'ils proviennent d'unités peptidiques liées entre elles ou non. Le pourcentage des fragments ainsi obtenus indique le "cross-linkage" du peptidoglycane.

Les disaccharides peptides sont ensuite soumis à l'action enzymatique de la N-acétylmuramyl-L-alanine amidase de Streptomyces (6)(126) qui hydrolyse la liaison amide entre le résidu lactique de l'acide muramique et l'alanine et donne les 2 constituants de base du peptidoglycane c'est-à-dire le disaccharide et le peptide.

L'enzyme AL 1 de Myxobacter (127)(128) coupe également les liaisons entre l'acide muramique et l'alanine ; il n'a aucune action sur les hexosamines et laisse les chaînes polysaccharidiques intactes ; il possède aussi une activité endopeptidasique.

A. Action du lysozyme.

Les conditions optimales de l'action enzymatique sont déterminées de la manière suivante : une suspension de parois purifiées P_C est incubée en présence de quantités croissantes de lysozyme pendant 24 heures en tampon acétate 0,01 M pH 5,4 à 37°. La lyse des parois est appréciée par la lecture de la turbidité de la suspension à 550 nm et par le dosage du pouvoir réducteur des disaccharides libérés après hydrolyse, les parois non dégradées étant séparées par centrifugation. Les résultats sont indiqués dans le tableau XIII.

Les conditions expérimentales de l'essai 3 qui présente une lyse maximum sont adoptées. 500 mg de parois P_C sont incubés avec 100 mg de lysozyme dans 80 ml de tampon acétate 0,01 M pH 5,4. 60 % seulement des parois sont solubilisées. La partie soluble contient la totalité

de la fraction glucidique sous la forme d'unités disaccharidiques. Elle est concentrée sous pression réduite à un volume de 2 ml et fractionnée par filtration sur deux colonnes montées en série de Sephadex G 50 et G 25 ($V_o^* = 500$ ml, $V_o + V_i^* = 1350$ ml). Les gels sont équilibrés et élués par une solution de LiCl 0,1 M. Dans les fractions obtenues après filtration les groupes réducteurs et le galactose sont dosés, les premiers par la méthode de Park et Johnson (129), le dernier par la méthode au phénol (130). Nous avons obtenu la courbe d'élution représentée figure 13.

Les valeurs des K_D^* et leur comparaison avec les valeurs obtenues au cours d'expériences similaires (16)(131) permettent d'identifier un disaccharide peptide monomère ($K_D = 0,65$), un bisdisaccharide peptide dimère ($K_D = 0,50$), un tridisaccharide peptide trimère ($K_D = 0,38$), des oligomères et un polymère ($K_D = 0$) auquel restent associés l'arabinose et le galactose.

TABLEAU XIII

Action du lysozyme sur les parois

<u>Essais</u>	<u>Suspension de parois</u>	<u>Lysozyme</u>	<u>Tampon acétate 0,2 M</u>	<u>H₂O</u>	<u>D.O.</u>	<u>disacch. libéré nmoles</u>	<u>% de lyse</u>
Témoin	25 μ l	0 μ l	25 μ l	450 μ l	1,3		
1	25	25	25	425	0,49	192	62
2	25	50	25	400	0,40	255	69
3	25	100	25	350	0,39	295	70

Les parois sont en suspension dans l'eau à 20 mg/ml, la solution de lysozyme est à 1 mg/ml. Les mesures sont effectuées après 24 heures d'action du lysozyme à 37°

* Pour la signification de V_o , V_i , K_D , voir la partie expérimentale.

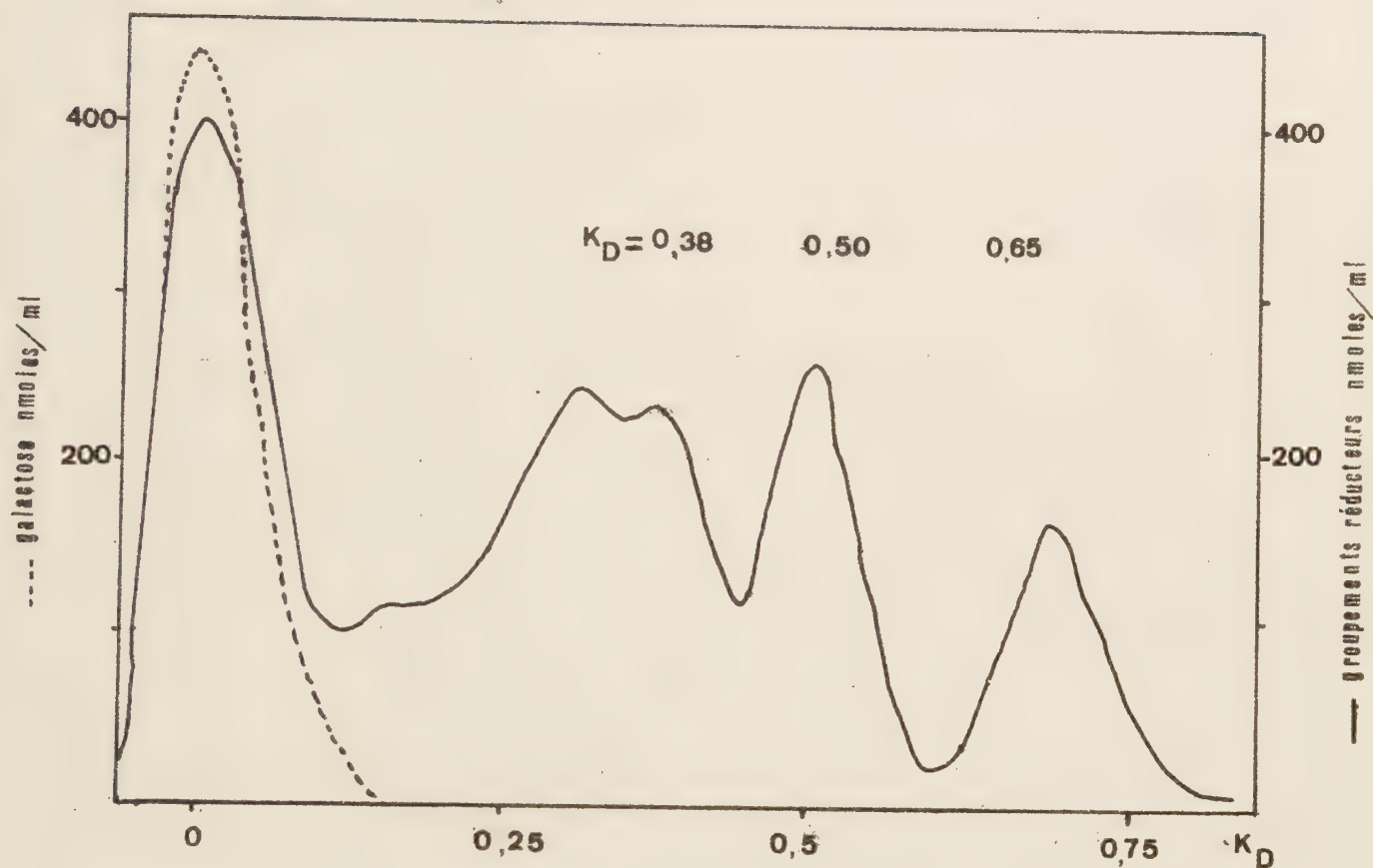


Figure 13 . Fractionnement sur colonne de Sephadex G 50 - G 25 (LiCl 0,1 M) des produits d'hydrolyse des parois P_C traitées par le lysozyme.

Les fractions correspondant à chacun des pics sont rassemblées et dessalifiées par passage sur une colonne de Sephadex G 25 ($V_0 = 80$ ml, $V_0 + V_i = 180$ ml) et élution à l'eau. La pureté des composés est contrôlée par chromatographie en couches minces de gel de silice dans le solvant acide isobutyrique-ammoniaque 0,5 M (5:3) (36). Ce solvant sépare les disaccharides peptides suivant leur degré de polymérisation.

Les acides aminés de chacune des fractions sont dosés par leurs DNP dérivés après hydrolyse acide, ce qui donne le pourcentage de chaque composé. Les résultats sont indiqués dans le tableau XIV.

TABLEAU XIV

Identification et dosage des composés provenant du passage sur Sephadex (voir figure 13)

Composé	K_D	Rf	%
Disaccharide monomère	0,65	0,60	9
Bis-disaccharide dimère	0,50	0,41	14
Tri-disaccharide trimère	0,38	0,26	20
Oligo-disaccharide oligomère	0,1 - 0,3		12
Poly-disaccharide polymère	0		44

Les valeurs de K_D résultent de la figure 13. Les valeurs des Rf sont celles de la chromatographie en couches minces dans acide isobutyrique-ammoniaque 0,5 M (5:3).

Ces résultats indiquent que certains groupements peptidiques ne sont pas reliés entre eux et donnent des monomères après hydrolyse par le lysozyme.

Hydrolyse enzymatique du disaccharide peptide monomère.

Le disaccharide peptide monomère est soumis à l'action amidasique de la N-acétylmuramyl-L-alanine amidase de *Streptomyces* (6)(126) qui hydrolyse la liaison amide entre le résidu lactique de l'acide muramique et l'alanine en libérant le disaccharide et le peptide.

L'hydrolyse est effectuée sur 5 μ moles de disaccharide peptide dans un tampon acétate 0,03 M pH 5,4 pendant 6 heures à 37°. Le dosage

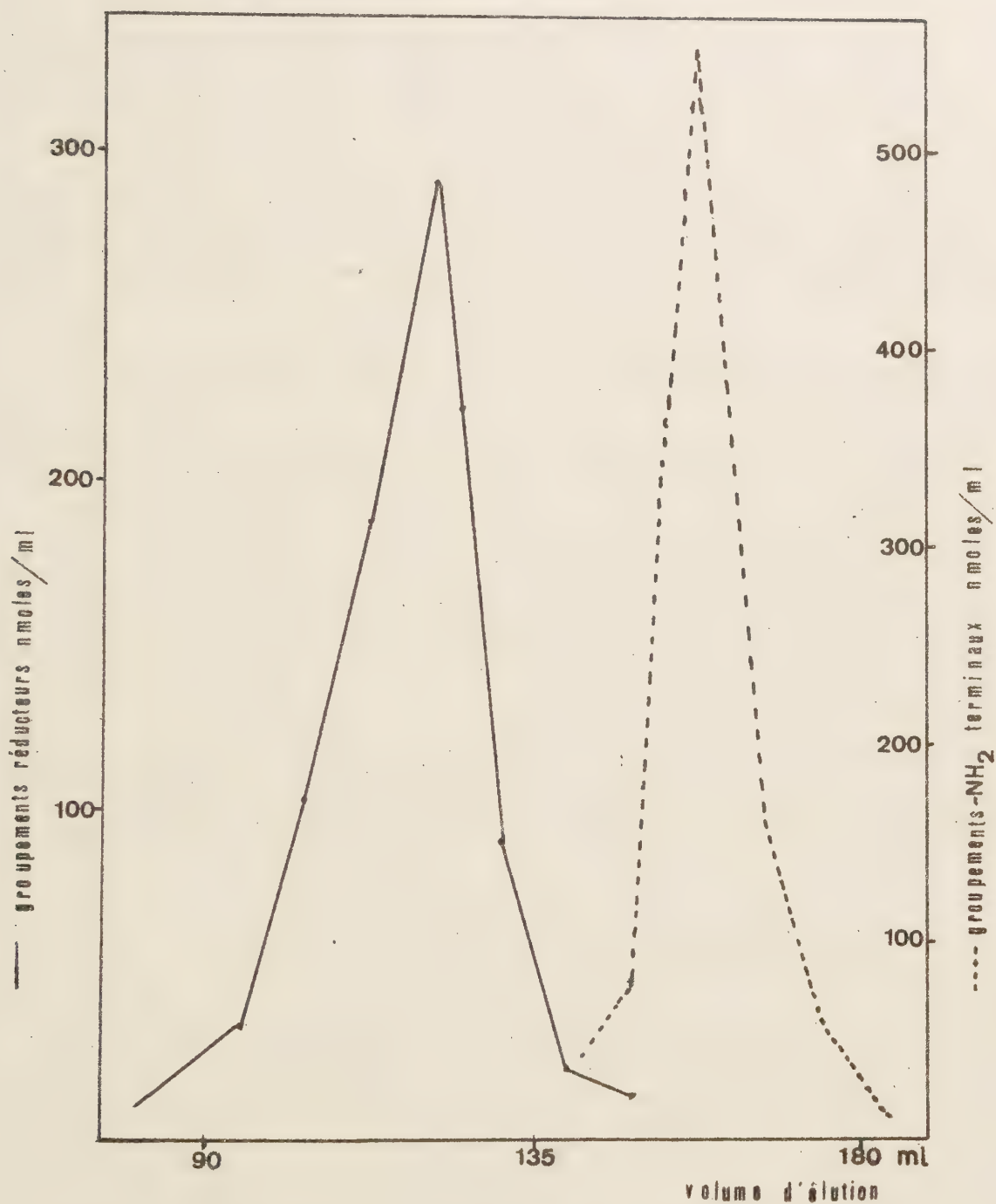


Figure 14. Fractionnement sur colonne de Sephadex G 25 des produits d'hydrolyse du disaccharide peptide monomère traité par l'amidase.

des groupements $-NH_2$ terminaux libérés, effectué par la méthode au fluorodinitrobenzène, montre que 80 % du disaccharide peptide est hydrolysé. Les produits de réaction sont chargés sur une colonne de Séphadex G 25 ($V_o = 80$ ml, $V_o + V_i = 180$ ml) et élués par l'eau. Le dosage des groupements réducteurs et aminés libres permet de localiser dans l'éluat le disaccharide et le peptide qui sont parfaitement séparés. La courbe obtenue est représentée figure 14. Les fractions correspondant à chaque composé sont rassemblées et concentrées, l'étude structurale complète du disaccharide et du peptide a été effectuée (voir p.82 et suivantes).

Hydrolyse enzymatique du bis-disaccharide peptide dimère.

Le bis-disaccharide peptide dimère est scindé également en disaccharide et peptide dimère par l'action de la N-acétylmuramyl-L-alanine amidase en utilisant des conditions analogues à celles décrites pour le disaccharide peptide monomère.

Après action de l'amidase les produits d'hydrolyse sont fractionnés sur une colonne de Sephadex G 25 ($V_o = 80$ ml, $V_o + V_i = 180$ ml) et élués par l'eau. Le graphique obtenu après dosage des groupements réducteurs et aminés indique deux pics distincts pour le disaccharide et le peptide (Figure 15).

Les mêmes composés : disaccharide, peptide monomère, peptide dimère ainsi que les peptides polymères supérieurs ont été également obtenus après l'action de l'enzyme AL 1 de Myxobacter sur les parois.

B. Action de l'enzyme AL 1 de Myxobacter.

Les parois purifiées P_C ne sont pas sensibles à l'action enzymatique de Myxobacter, elles le deviennent après hydrolyse ménagée avec HCl 0,1 N à 60° pendant 12 heures ; ce traitement élimine l'arabinogalactane.

Les conditions de l'action enzymatique ont été précisées dans les essais préliminaires suivants : les parois traitées à l'acide chlorhydrique sont incubées en présence de quantités croissantes d'enzyme dans le tampon véronal 0,01 M pH 9 pendant 24 heures. Après dilution convenable la lyse des parois est appréciée par turbidimétrie. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau XV.

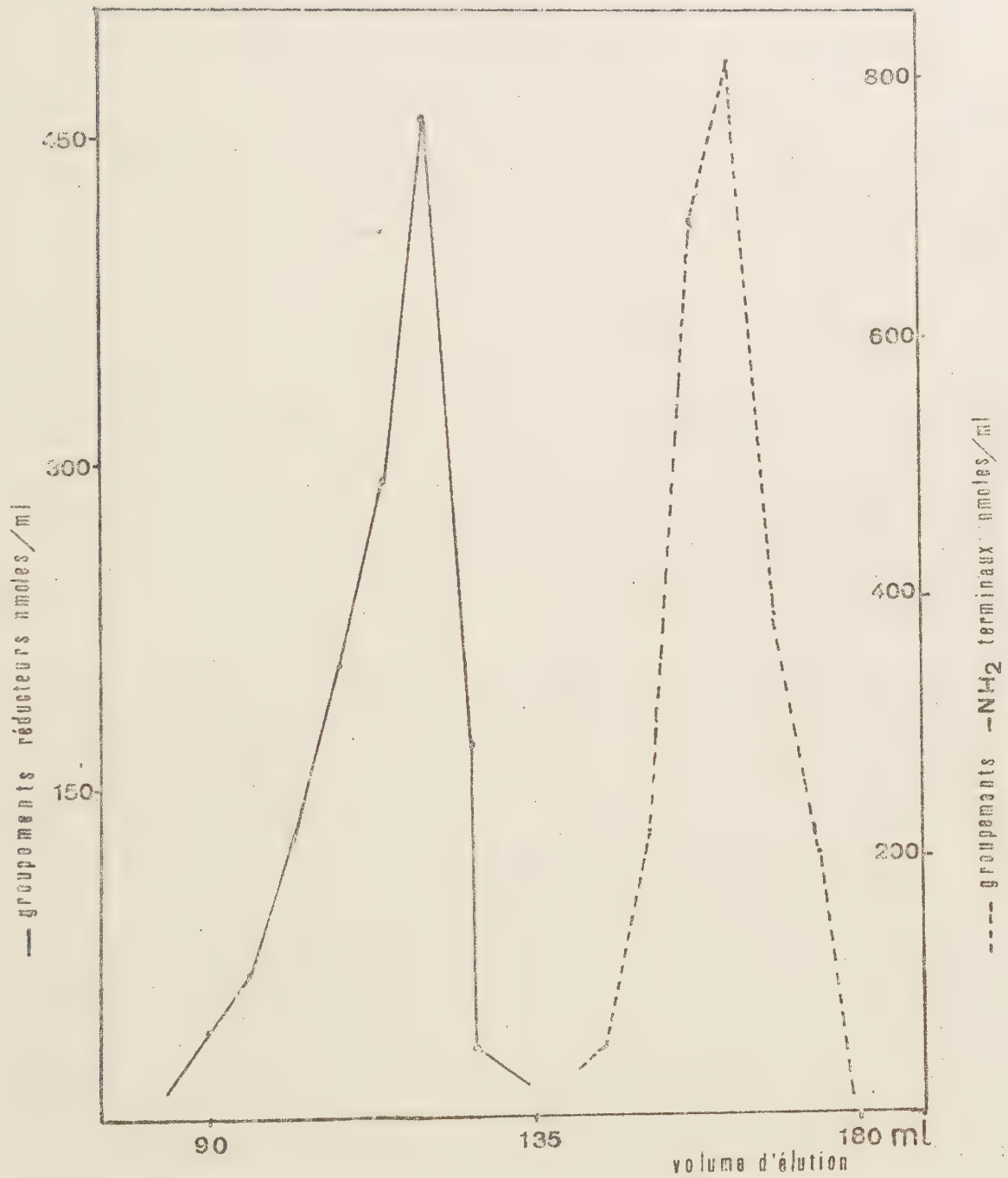


Figure 15. Fractionnement sur colonne de Sephadex G 25 des produits d'hydrolyse du disaccharide peptide dimère traité par l'amidase.

TABLEAU XV

Action de l'enzyme de *Myxobacter* sur les parois

Essais	Suspension de parois	Enzyme (unités)	Tampon 0,25 M	H ₂ O	D.O.	% de lyse
Témoin	25 µl	0	10 µl	215 µl	0,5	0
1	25	400	10	215	0,11	77
2	25	800	10	215	0,06	88
3	25	1200	10	215	0,02	96

Les parois sont en suspension dans l'eau à 20 mg/ml. L'activité de l'enzyme a été testée suivant la méthode décrite par Ensign et Wolfe (127) en utilisant une suspension de *Micrococcus lysodeikticus* au lieu de *Arthrobacter crystallopoietes*. La lecture est effectuée au bout de 24 h, après avoir dilué chaque essai avec 0,7 ml d'eau.

250 mg de parois sont incubés avec 600.000 unités d'enzyme, dans 60 ml de tampon véronal 0,01 M pH 9. Après 24 heures de réaction le milieu est limpide et la lyse des parois est totale. La solution amenée à un volume de 2 ml est fractionnée par passage sur colonne de Sephadex G 25 ($V_0 = 300$ ml, $V_0 + V_i = 650$ ml), le gel est équilibré et l'élution est réalisée par l'acide acétique 0,1 N. Sur les fractions recueillies les groupements $-NH_2$ sont dosés par leurs DNP dérivés et les hexosamines selon la méthode de Morgan-Elson après hydrolyse chlorhydrique et ré-acétylation (120). La figure 16 schématise le fractionnement.

D'après les valeurs obtenues pour les K_D , on met en évidence les pics correspondant aux peptides monomères (I), dimères (II), trimères (III), oligomères (IV) et polymères (V). Ces derniers renferment encore la partie polysaccharidique du peptidoglycane qui a résisté à l'action enzymatique. Ces composés sont analysés par chromatographie en couches minces de cellulose dans le solvant butanol-pyridine-acide acétique-eau (30:20:6:24) en présence des peptides monomères et dimères isolés après action du lysozyme et de l'amidase sur les parois.

Après hydrolyse chlorhydrique de chaque type de peptides les acides aminés sont dosés par leurs DNP dérivés, ce qui permet d'établir le pourcentage de chaque fraction.

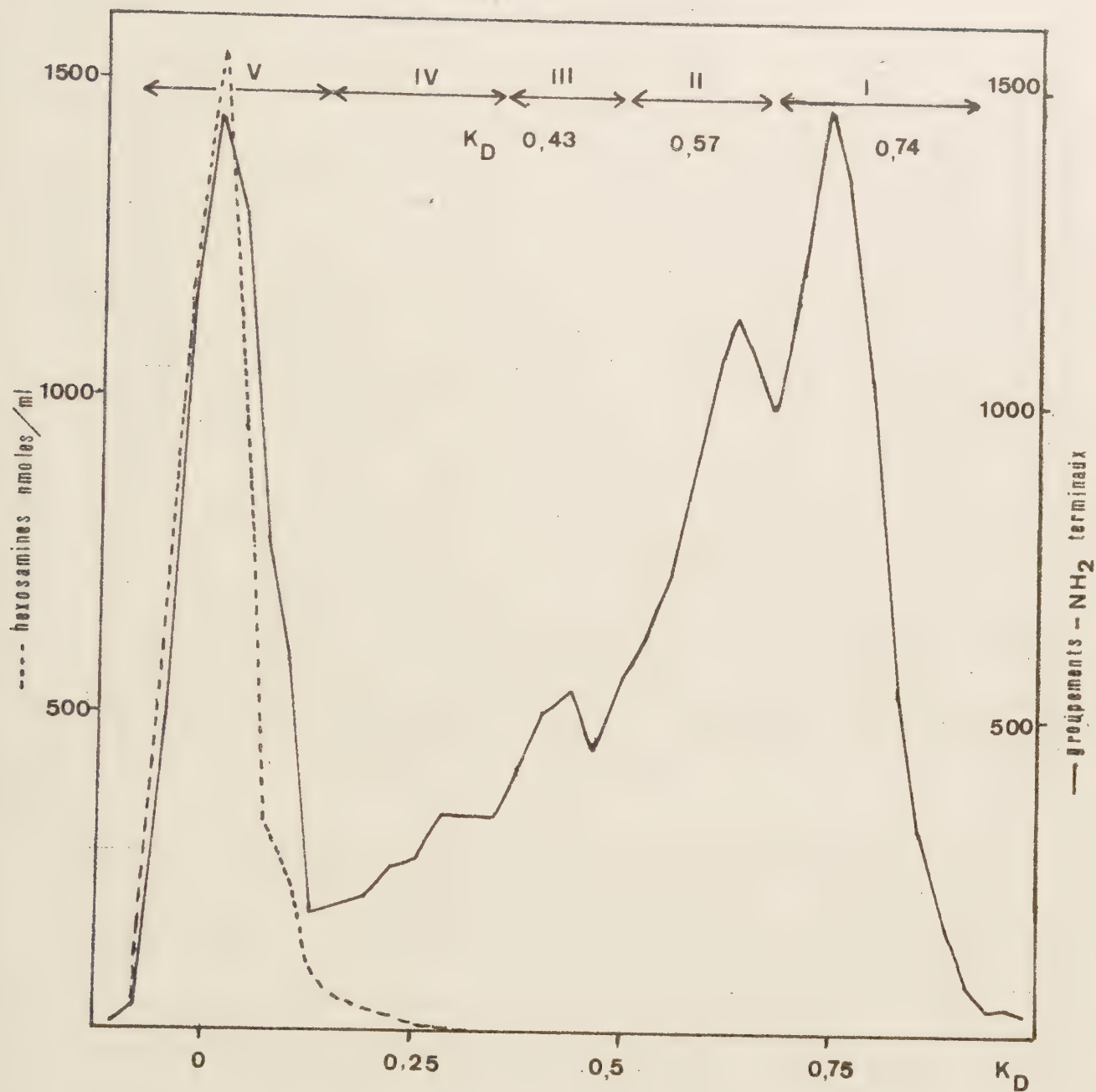


Figure 16. Fractionnement sur colonne de Sephadex G 25 (CH_3COOH 0,1 M) des produits d'hydrolyse des parois P_D traitées par l'enzyme AL 1 de Myxobacter.

Peptides monomères	:	20 %
dimères	:	16 %
trimères	:	13 %
oligomères	:	13 %
polymères	:	38 %

Si on compare ces résultats avec ceux qui ont été obtenus après action du lysozyme, on remarque que les quantités de monomères et de dimères obtenues par ce dernier fractionnement sont plus importantes. L'augmentation des peptides monomères et dimères a lieu au détriment des polymères et des trimères. Il est admis que l'enzyme AL 1 de *Myxobacter* possède une activité amidasique et qu'il est aussi capable d'hydrolyser les liaisons interpeptidiques (6). Ainsi les études de cinétique enzymatique effectuées sur les parois de *Staphylococcus aureus* et d'*Arthrobacter crystallopoietes* (132) ont montré qu'il agit d'abord sur les liaisons interpeptidiques et ensuite, avec une vitesse beaucoup plus faible, sur la liaison amide entre l'acide muramique et l'alanine. Cependant l'action de l'enzyme de *Myxobacter* porterait plus spécialement sur les ponts interpeptidiques constitués par un acide aminé ou un peptide et non sur les liaisons directes entre 2 chaînes peptidiques.

Les résultats obtenus avec les parois de *N.kirovani* montrent que l'enzyme hydrolyse totalement la liaison amide entre l'acide muramique et l'alanine et plus faiblement les liaisons de "cross-linkage" entre les peptides. Des conclusions analogues ont été obtenues à partir des parois de *Corynebacterium diphtheriae* (30) et de *Mycobacterium smegmatis* (54) : l'action principale de l'enzyme semble être la rupture de la liaison amide à la "jonction" entre le glycane et les fragments peptidiques.

Obtention du disaccharide à partir de la fraction polysaccharidique.

La fraction V de polymères exclue de la colonne de Sephadex G 25 (figure 16) renferme un mélange de peptides polymères et de polysaccharides. Par action du lysozyme, les chaînes polysaccharidiques sont scindées en disaccharides.

La fraction V lyophilisée est incubée avec 5 mg de lysozyme dans 24 ml de tampon acétate 0,01 M pH 5,4 à 37° pendant 24 heures. Le volume de la solution concentré à 2 ml est déposé au sommet d'une colonne de Sephadex G 25 ($V_0 = 300$ ml; $V_0 + V_i = 650$ ml), l'élution est effectuée par l'acide acétique 0,1 M. Après dosage des groupements réducteurs et des $-NH_2$ terminaux par les DNP dérivés, on obtient la courbe représentée figure 17. Le pic I est identifié au disaccharide par chromatographie sur papier en utilisant comme témoin le composé isolé précédemment. Le pic II est constitué de tétrasaccharide. Par hydrolyse acide, il libère de la glucosamine et de l'acide muramique en quantité équimoléculaire ; soumis à un nouveau traitement au lysozyme il est partiellement hydrolysé en disaccharide I.

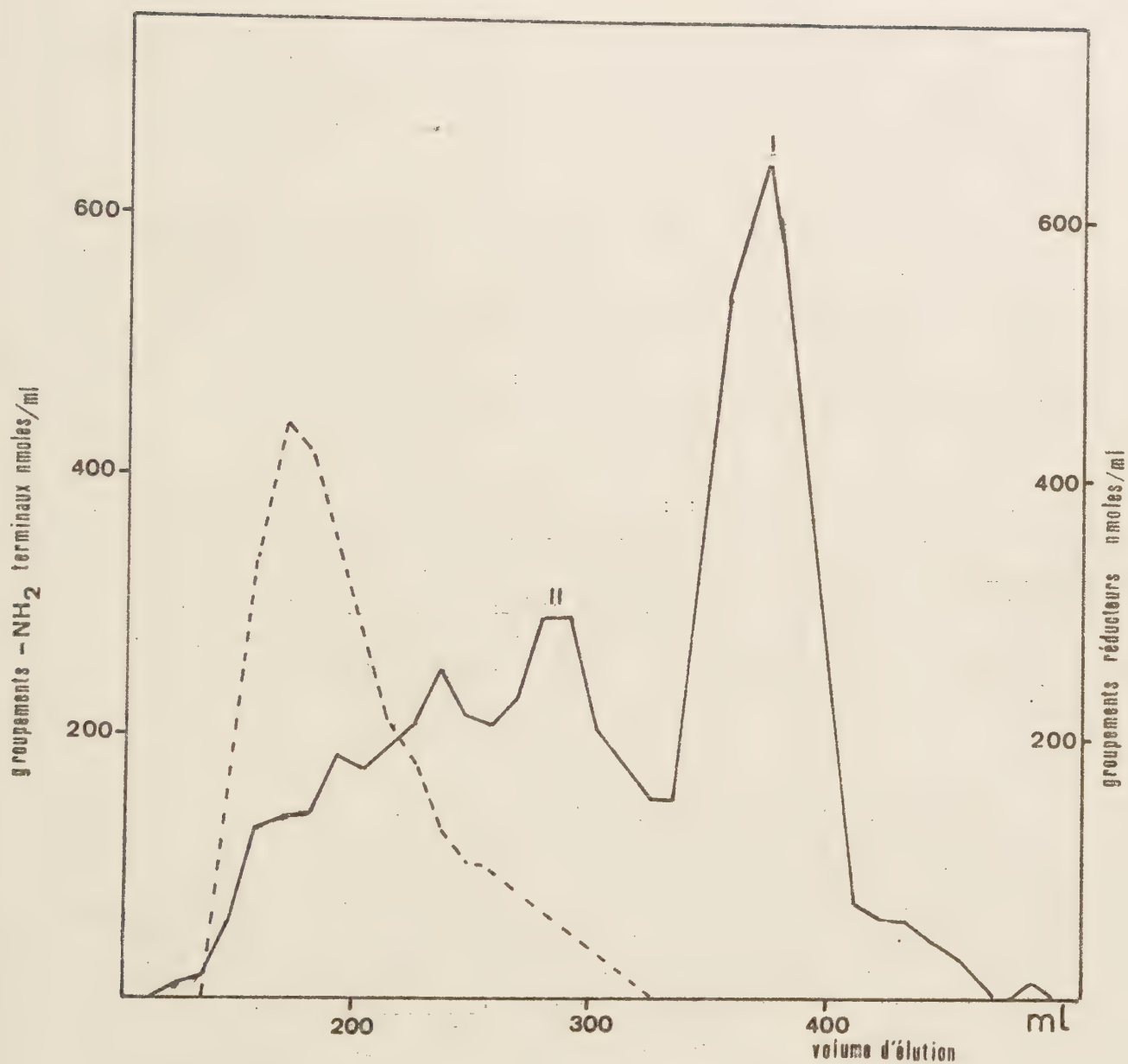


Figure 17. Fractionnement sur colonne de Sephadex G 25 du pic V (fig. 16) traité par le lysozyme.

III. ETUDE DU DISACCHARIDE

Les disaccharides qui proviennent de l'action de l'amidase sur le disaccharide peptide monomère, sur le bis-disaccharide peptide dimère et de l'action du lysozyme sur les polysaccharides sont analysés par chromatographie sur papier. Après révélation par le réactif de Sharon (133) ils donnent tous une même tache fluorescente.

Après hydrolyse par HCl 3 N pendant 3 heures le disaccharide libère de l'acide muramique et de la glucosamine en quantité équimoléculaire. Il est réduit par une solution aqueuse de NaBH_4 puis hydrolysé, on note alors la disparition de la moitié des hexosamines totales dosées par la méthode de Morgan-Elson et de la totalité de l'acide muramique mis en évidence par chromatographie sur papier ; l'acide muramique est donc situé à l'extrémité réductrice du disaccharide.

Le disaccharide est chromatographié sur papier dans le solvant butanol-acide acétique-eau (5:1:2) en présence de N-acétylglucosamine, d'acide N-acétylglucosaminyl- β -1 $\rightarrow$ 4-N-acétylmuramique isolé de Micrococcus lysodeikticus (134)(40) et d'acide N-acétylglucosaminyl-N-glycolylmuramique isolé de Mycobacterium smegmatis (18)(54). Le R_f de ce dernier est identique à celui du disaccharide de N.kirovani, $R_f = 0,70$ par rapport au disaccharide de M.lysodeikticus pris comme unité.

Ce résultat est confirmé par la spectrométrie de masse.

Etude du spectre de masse du disaccharide.

Le disaccharide est méthylé par l'iodure de méthyle selon la méthode décrite par Hakomori (135) qui utilise le méthylsulfinylcarbanion de Corey (136). Le disaccharide perméthylé est soumis à la spectrométrie de masse, le spectre obtenu, représenté figure 18, est identique à celui que donne le disaccharide isolé de M.smegmatis (18).

Le pic moléculaire est présent à $m/e = 638$, il correspond à la formule 2 .

Les fragmentations les plus importantes selon a, b, c, d sont indiquées sur la formule 2, elles donnent des pics à :

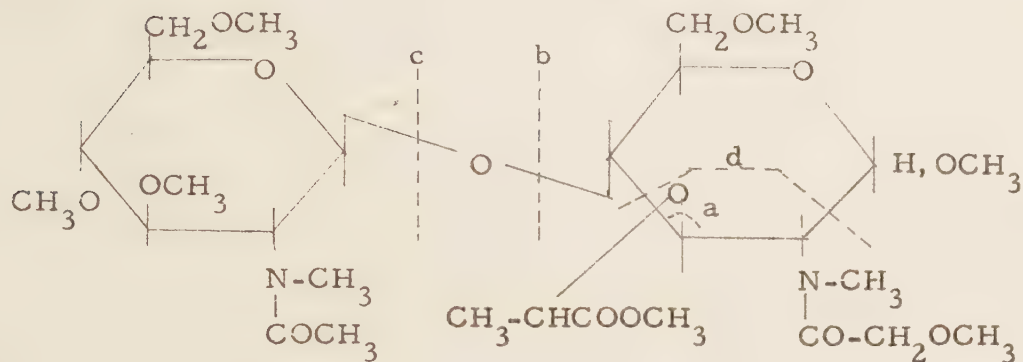
$m/e = 535$ (M-103) avec perte du fragment lactyle ($\text{CH}_3 - \underset{\text{O}}{\text{CH}} - \text{COOCH}_3$)
selon a,

$m/e = 362$ qui correspond à la coupure de la liaison osidique selon b,

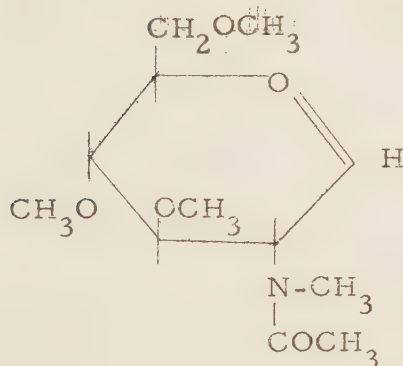
$m/e = 260$ qui provient de la coupure de la liaison osidique selon c

et correspond à l'ion oxonium (formule 3). Cet ion est dû à la N-acétyl-

glucosamine et confirme sa position : le groupement réducteur de la glucosamine est engagé dans la liaison osidique du disaccharide.



Formule 2



Formule 3

$m/e = 231$ qui provient de la coupure selon d et correspond au fragment contenant les carbones 2 et 3 de l'acide muramique (137), (formule 4).

Ce dernier pic est analogue au pic $m/e = 201$ du disaccharide perméthylé de *Micrococcus lysodeikticus* (18) qui possède un pic moléculaire à 608 au lieu de 638. La différence entre les deux disaccharides provient de la substitution du carbone 2 ou 3 ; or les deux disaccharides

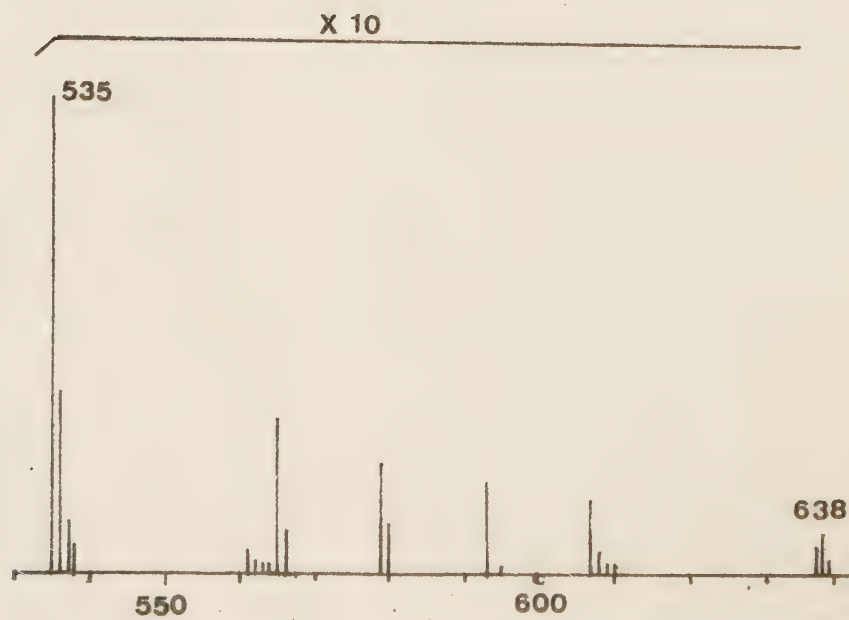
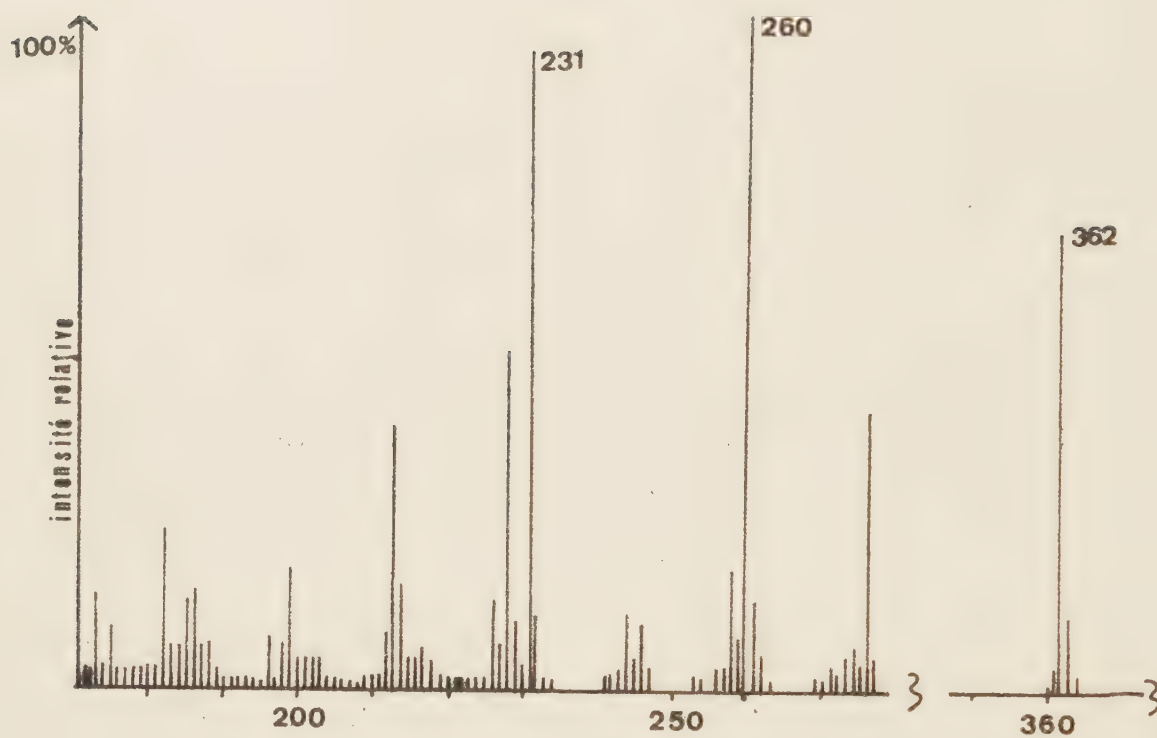
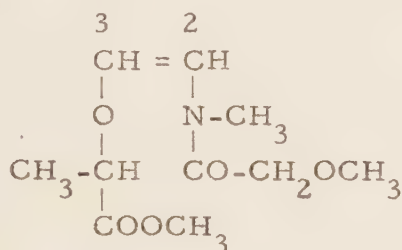


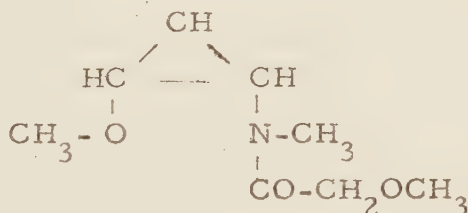
Figure 18. Spectre de masse du disaccharide perméthylé.

libèrent par hydrolyse de l'acide muramique, ce qui implique un groupement lactyle sur le carbone 3. La différence de 30 unités de masse provient donc de la substitution du C₂. Dans le disaccharide de N.kirovani, comme dans celui de M.smegmatis, l'azote de C₍₂₎ est substitué par un groupement -COCH₂OCH₃. Une perdeutériométhylation du disaccharide de M.smegmatis a montré d'autre part qu'aucun hydroxyle n'était méthylé dans le produit naturel (18).



Formule 4

Nous pouvons conclure en comparant les spectres de masse et le comportement chromatographique des 2 composés que le substituant de la fonction amine de l'acide muramique est un groupement glycolyle dans le disaccharide de N.kirovani comme dans celui de M.smegmatis. La similitude des spectres de masse des disaccharides perméthylés de M.lysodeikticus et de M.smegmatis avec les différences indiquées précédemment et dues à la présence du groupement glycolyle dans ce dernier a permis de conclure que la N-acétylglucosamine était liée au C₄ de l'acide muramique dans le disaccharide de M.smegmatis (18). La même conclusion peut être apportée pour le disaccharide de N.kirovani. Cette hypothèse est confirmée par l'absence sur les spectres de M.smegmatis et de N.kirovani du pic à m/e = 172 qui correspondait à un fragment comportant les atomes de carbone 2, 3, 4 (formule 5).



Formule 5

L'absence de ce pic exclut la substitution -OCH₃ du C₄ qui, par conséquence, doit être engagé dans la liaison osidique.

Hydrolyse enzymatique du disaccharide.

Le disaccharide de N.kirovani est hydrolysé par le suc digestif d'Hélix pomatia qui contient une N-acétylglucosaminidase. L'hydrolyse est effectuée dans un tampon acétate d'ammonium 0,1 M pH 5,0 pendant 24 heures à 37°. Les produits d'hydrolyse sont analysés par chromatographie sur papier dans le solvant butanol-acide acétique-eau (5:1:2) et révélation par le réactif de Sharon (133). Il y a libération de N-acétylglucosamine ($R_f = 1$) et d'acide N-glycolylmuramique ($R_f = 1,35$), ce dernier est identifié en utilisant comme témoin le produit synthétique* (138). Le disaccharide est également hydrolysé par la β -N-acétylglucosaminidase de l'épididyme de porc (139)(140). La spécificité de l'enzyme permet de conclure à l'anomérie β de la liaison entre les deux sucres.

Réaction de Morgan-Elson.

La réaction de Morgan-Elson est spécifique des sucres acétamidés : chauffés en milieu alcalin, ils subissent une désaturation et donnent un composé qui réagit avec le p-diméthylaminobenzaldéhyde. Le produit de réaction coloré en rouge permet le dosage. Une étude de la réaction effectuée sur les hexosamines et les disaccharides préparés à partir des parois bactériennes a été réalisée par Ghuysen et coll. (29) et par Tipper (141).

Une hexosamine N-acétylée est chauffée 7 minutes à 100° en milieu alcalin pour donner une coloration maximum ; quand la réaction est effectuée sur un disaccharide, le temps de chauffage doit être prolongé jusqu'à 30 minutes (120), il se produit durant cette période une hydrolyse alcaline et ce sont les produits d'hydrolyse qui donnent la coloration (15).

En étudiant comparativement la réaction de Morgan-Elson sur les disaccharides de N.kirovani et de B.rettgeri (22) on remarque que le disaccharide de N.kirovani présente au bout de 7 minutes de chauffage en milieu alcalin une réaction plus positive que le disaccharide de B.rettgeri. Si le chauffage est prolongé pendant 30 minutes, la réaction devient encore plus intense et reste toujours supérieure à celle qui est donnée dans les mêmes conditions par le disaccharide de B.rettgeri. Les coefficients d'extinction molaires trouvés sont indiqués dans le tableau XVI.

* Nous remercions Messieurs J.F.Petit, Institut de Biochimie, Orsay, et P.Sinaÿ, Université d'Orléans, pour l'envoi d'échantillons d'acide N-glycolylmuramique synthétique.

TABLEAU XVI

Coefficients d'extinction molaires calculés à 585 nm.

<u>Temps de chauffage</u>	<u>7 minutes</u>	<u>30 minutes</u>
Disaccharide de <u>N.kirovani</u>	10000	17000
Disaccharide de <u>B.rettgeri</u>	2000	7700
Acide N-acétylglucosaminyl β 1 $\rightarrow$ 4 N-acétylmuramique (120)	3500	9500
N-acétylglucosamine (120) (valeurs théoriques)	20000	14000
N-acétylglucosamine (valeurs trouvées)	21000	15800
Acide N-glycolylmuramique	10500	8000

Les courbes d'absorption du composé coloré donné par la N-acétylglucosamine, l'acide N-glycolylmuramique, le disaccharide de B.rettgeri et le disaccharide de N.kirovani présentent le même profil avec 2 maxima d'absorption, le plus important se situe à 585 nm et l'autre à 544 nm. Les courbes obtenues sont identiques à celles données par Aminoff et coll. (142) et Reissig et coll. (143). On pourrait tenter d'expliquer la forte réaction de Morgan-Elson donnée par le disaccharide de N.kirovani par une liaison 1 $\rightarrow$ 6 entre les deux sucres. En effet l'acide N-acétylglucosaminyl β 1 $\rightarrow$ 6-N-acétylmuramique synthétisé par Sharon et coll. (134) donne une réaction de Morgan-Elson après 3 min. de chauffage en milieu alcalin beaucoup plus forte que le disaccharide naturel 1 $\rightarrow$ 4 isolé de M.lysodeikticus et traité dans les mêmes conditions. Nous savons que la spectrométrie de masse suggère une liaison 1 $\rightarrow$ 4 pour le disaccharide de N.kirovani ; cependant cette suggestion basée sur l'absence d'un pic ne peut être considérée comme une preuve suffisante. Aussi, pour connaître la liaison osidique, nous avons oxydé le disaccharide par le periodate.

Oxydations periodiques.

Nous avons fait agir le periodate sur le disaccharide de N.kirovani et sur l'acide N-glycolylmuramique de synthèse avant et après réduction par NaBH_4 en dosant le periodate consommé et le formol produit.

Dans les deux cas, au bout de 15 minutes de réaction, une faible quantité de periodate est utilisée lorsque la réaction est effectuée sur les produits naturels. Après réduction les 2 composés consomment au bout de 15 minutes une mole de periodate par mole en libérant dans le même temps une molécule de formol. Il y a coupure de l'hydroxyle primaire du carbone 6 libéré par réduction, cet hydroxyle n'est donc pas engagé dans la liaison osidique qui est par conséquent 1→4.

L'étude de la cinétique de la réaction a donné des résultats intéressants, ils sont indiqués dans le tableau XVII.

TABLEAU XVII

Oxydations periodiques de l'acide N-glycolylmuramique et du disaccharide de N.kirovani avant et après réduction.

<u>Temps de réaction</u>	<u>Periodate consommé</u>		<u>Formol produit</u>	
	15 min.	26 h.	15 min.	26 h.
Acide N-glycolylmuramique	0,3	1,6	0,2	0,8
Acide N-glycolylmuramique réduit	1,5	2	1	1
Disaccharide de <u>N.kirovani</u>	0,3	1,5	0,2	0,6
Disaccharide de <u>N.kirovani</u> réduit	1	2,2	1,1	1,3

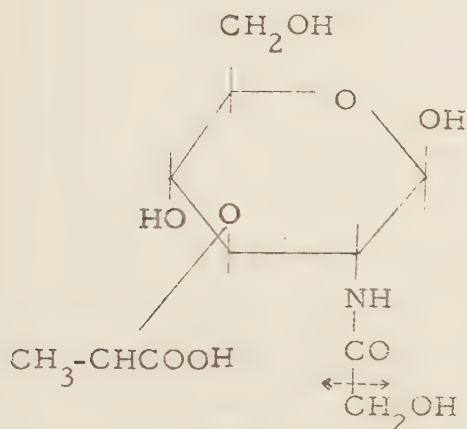
Les résultats sont exprimés en moles de periodate et de formol par mole d'acide N-glycolylmuramique et de disaccharide.

L'acide N-glycolylmuramique consomme progressivement 1,6 mole de periodate par mole en 26 heures en libérant dans les mêmes conditions 0,8 mole de formol. Après réduction, la consommation de periodate atteint 2 moles et une mole de formol est libérée. Le disaccha-

ride de N.kirovani absorbe 1,5 mole de periodate en donnant 0,6 mole de formol par mole en 26 heures. Après réduction il y a 2,2 moles de periodate consommé pour 1,3 mole de formol produit.

Pour expliquer la libération de formol par action du periodate sur l'acide N-glycolylmuramique et la consommation de 1,6 mole d'oxydant par mole de sucre, on peut supposer qu'il existe un équilibre entre les deux formes A et B (figure 19).

Forme A



Forme B

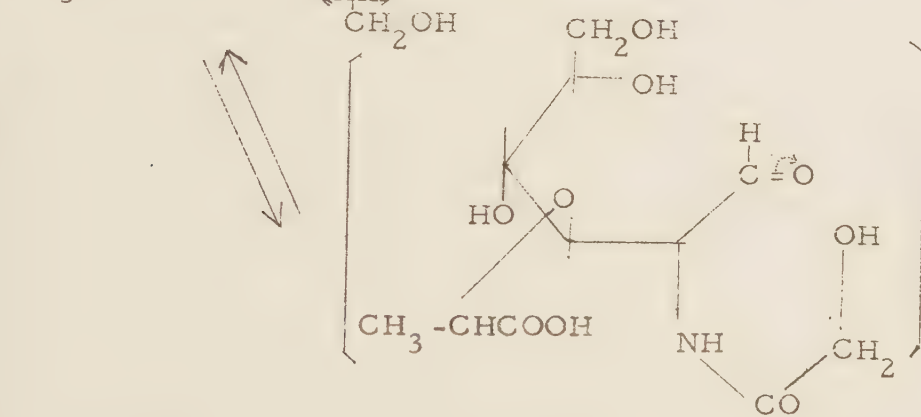
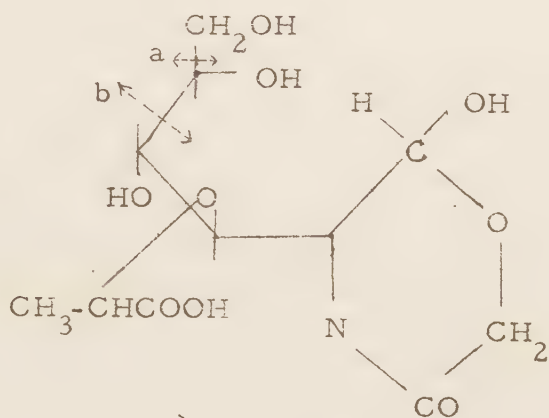
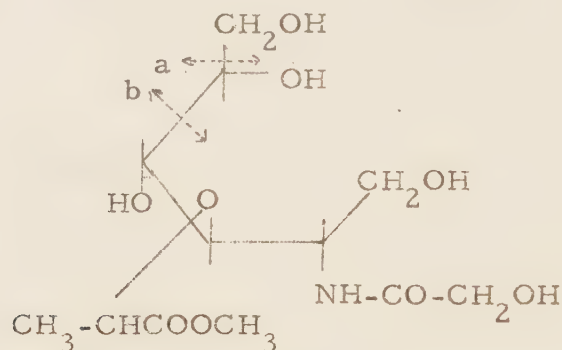


Figure 19

Dans la forme B le cycle pyranique de l'osamine est ouvert et une cyclisation se produit entre le groupement glycolyle et la fonction aldéhydique. On peut constater sur les modèles moléculaires que le passage d'une forme à l'autre s'effectue facilement, il n'existe aucun empêchement stérique.

Sous la forme A, le periodate pourrait éventuellement couper le groupement glycolyle en libérant du formol. Sous la forme B, le periodate peut agir sur les deux fonctions glycols contiguës suivant a et b, la coupure selon a s'accompagne de production de formol. Au fur et à mesure de l'oxydation, l'équilibre est déplacé et la réaction est

progressive. Quand l'acide N-glycolylmuramique est réduit, le composé linéaire obtenu peut être oxydé rapidement par le periodate en donnant du formol (coupure a), la coupure selon b s'effectue plus lentement (Formule 6).



Formule 6

Nous avons cherché à préciser le mode d'action du periodate sur l'acide N-glycolylmuramique (forme A ou B) ; après différents temps d'oxydation le periodate en excès est détruit par addition d'éthylène-glycol, l'échantillon est hydrolysé et analysé par chromatographie sur papier, les taches sont révélées à la ninhydrine, éluées et dosées colorimétriquement.

On constate avec l'acide N-glycolylmuramique la disparition progressive de l'acide muramique après hydrolyse ce qui indique une destruction de la molécule, la réaction s'effectue donc sur la forme B. Le même mécanisme peut s'appliquer au disaccharide de N.kirovani.

Hydrolyses alcalines.

Le fait que la réaction de Morgan-Elson soit plus forte dans le cas du disaccharide N-glycolylé que dans celui du disaccharide N-acétylé pourrait s'expliquer par une labilité plus grande de la liaison osidique en milieu alcalin.

Les deux disaccharides isolés des parois de N.kirovani et de B.rettgeri (22) sont chauffés en tubes scellés en présence de tétraborate à 1 %, pendant différents temps, dans des conditions analogues à celles qui sont utilisées pour la réaction de Morgan-Elson (120). Après réduction par NaBH_4 , la glucosamine résiduelle est dosée par la réaction de Morgan-Elson.

Après 30 minutes de chauffage, 36 % seulement de glucosamine est présente ce qui correspond à 64 % de disaccharide hydrolysé dans le cas de N.kirovani. Le disaccharide de B.rettgeri est hydrolysé beaucoup plus lentement puisqu'après 30 minutes de chauffage il reste 72 % de glucosamine c'est-à-dire que 28 % seulement du disaccharide

est hydrolysé.

Il est admis que durant la période de chauffage en milieu alcalin il y a élimination de la partie lactyle de l'acide muramique et formation d'une double liaison sur les carbones 2 et 3 (141). L'insaturation rend la liaison osidique plus sensible à l'hydrolyse. La présence du groupement glycolyle plus nucléophile que le groupement méthyle peut faciliter la désaturation et par conséquence l'hydrolyse.

Conclusions sur le disaccharide.

Le glycane des parois de N.kirovani est donc constitué d'unités disaccharidiques d'acide N-acétylglucosaminyl β 1 $\rightarrow$ 4 N-glycolylmuramique. Cette structure est identique à celle du glycane des Mycobactéries. La présence d'unités d'acide N-acétylglucosaminyl β 1 $\rightarrow$ 4 N-acétylmuramique a été trouvée dans toutes les bactéries étudiées (6), la seule variation consiste en une acétylation de l'hydroxyle du carbone 6 de l'acide N-acétylmuramique dans les parois de Staphylococcus aureus (15) et de Lactobacillus acidophilus (16)(17).

La présence d'acide N-glycolylmuramique semble spécifique de quelques bactéries : Mycobactéries, Nocardia et probablement Microspora (20), les genres voisins Streptomyces et Corynebacterium possédant le dérivé N-acétylé de l'acide muramique (19) comme les autres bactéries. Les Nocardia présentent ainsi une analogie nouvelle avec les Mycobactéries.

Petit et coll. ont isolé l'UDP-N-glycolylmuramyl-(Ala-Glu-DAP) à partir d'une culture de M.phlei croissant en présence de cyclosérine (144). Cet antibiotique inhibe la biosynthèse des parois et conduit à l'accumulation du précurseur UDP-N-acylmuramyl-(Ala-Glu-DAP)(145). Ce résultat montre que la glycolylation de l'acide muramique s'effectue avant son incorporation dans le peptidoglycane. L'acide N-acétylmuramique provient lui-même de la N-acétylglucosamine après condensation de l'énolpyruvate et réduction ultérieure (146)(147).

On aurait donc le processus suivant :

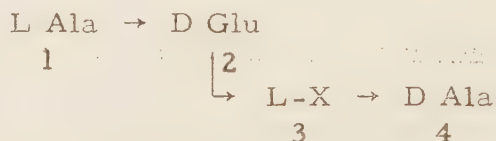
UDP-N-acétylglucosamine $\rightarrow$ acide UDP-N-acétylmuramique $\rightarrow$ acide UDP-N-glycolylmuramique.

Des résultats analogues ont été obtenus par Takayama à partir d'une souche de M.tuberculosis (148). Cette voie biogénétique rappelle celle qui a été décrite par Shoop et coll. (149) pour l'acide N-glycolylneuraminique dans les glandes sous-maxillaires du porc ; l'acide N-glycolylneuraminique est formé par oxydation du composé N-acétylé.

Ceci laisse supposer dans les Mycobactéries et dans les Nocardia l'existence d'une oxygénase spécifique capable d'oxyder l'acide N-acétylmuramique en acide N-glycolylmuramique.

IV. ETUDE DES PEPTIDES

La séquence peptidique des peptidoglycanes bactériens est du type :



Dans les parois de N.kirovani l'acide aminé n° 3 est constitué par le meso DAP . Ce type d'unité peptidique a été trouvé et étudié initialement à partir de la paroi d'Escherichia coli (4). Dans cette bactérie, à côté du térapeptide L Ala→D Glu→meso DAP→D Ala, on a montré la présence du tripeptide L Ala→D Glu→meso DAP, la D alanine manquante ayant été enlevée par action d'une carboxypeptidase autolytique (150)(151). Ces peptides monomères ont également été retrouvés dans le peptidoglycane de Bacillus megaterium (13)(14)(152). Il faut noter que dans cette bactérie 15 % des résidus d'acide diaminopimélique ont la configuration DD. Le tripeptide accompagné du tripeptide monoamidé sur le carboxyle de l'acide glutamique a été caractérisé dans les parois de B.licheniformis (153) et le térapeptide monoamidé dans celles de B.cereus (154). Warth (35) a étudié le peptidoglycane des cellules végétatives et du cortex des spores de B.subtilis. L'unité peptidique est identique à celle trouvée chez E.coli avec une amidation supplémentaire du groupement -COOH du DAP dans les cellules végétatives. Ce type de peptides est également le constituant du peptidoglycane de Corynebacterium diphtheriae (30) où les 2 carboxyles de l'acide glutamique et de l'acide diaminopimélique sont substitués par des groupements amides. Enfin à partir de plusieurs souches de Mycobactéries on a isolé et identifié un mélange de térapeptides et tripeptides monoamidés et diamidés (32).

Il faut noter que l'isomère LL de l'acide diaminopimélique est le constituant des parois des Streptomyces et de quelques autres espèces bactériennes (36).

A. Peptides monomères.

Les peptides monomères ont été obtenus par deux voies différentes, d'une part après action du lysozyme sur les parois P_G et coupure du disaccharide peptide monomère par la N-acétylmuramyl-L-alanine amidase, et d'autre part après action de l'enzyme AL 1 de Myxobacter

sur les parois P_D . Ils ont été étudiés par chromatographie en couches minces sur plaque de cellulose et par électrophorèse. Par chromatographie dans le solvant butanol-pyridine-acide acétique-eau (30:20:6:24) les peptides monomères donnent deux taches voisines révélées à la ninhydrine de R_f respectifs 0,35 et 0,38, la tache la plus abondante est celle de $R_f = 0,38$; elles correspondent vraisemblablement à un tétra-peptide et à un tripeptide. Par électrophorèse à pH 4,1, ils donnent une tache principale accompagnée de taches d'intensité plus faible. Les peptides isolés renferment donc plusieurs constituants, nous les avons séparés et purifiés par passage sur colonne de résine cationique (Beckman PA 35)(35),(32).

Fractionnement et purification des peptides monomères *

La solution est placée sur une colonne de résine équilibrée avec le tampon pyridine-acide acétique pH 3,1 (0,2 M en pyridine). Les peptides sont élués d'abord par 40 ml de ce tampon et ensuite par un gradient linéaire effectué avec 300 ml du tampon pH 3,1 et 300 ml du tampon pyridine-acide acétique pH 5,1 (0,2 M en pyridine). Sur une partie aliquote des fractions recueillies, on dose les acides aminés après hydrolyse alcaline selon la méthode colorimétrique de Moore et Stein (155). La courbe obtenue est représentée figure 20, elle comporte 5 pics principaux.

Les pics II, III, IV et V libèrent après hydrolyse chlorhydrique uniquement les acides aminés du peptidoglycane : Glu, Ala, DAP. La dégradation d'Edman a été effectuée suivant la technique décrite par Gray et Smith (156) sur ces 4 fractions afin de vérifier l'enchaînement peptidique ; l'alanine est N-terminale et l'acide aminé suivant, démasqué après un premier cycle d'Edman est l'acide glutamique. Le deuxième cycle ne libère aucun aminoacide, ce qui indique que l'acide glutamique est lié par son carboxyle *.

a) Etude du tétrapeptide.

Le pic IV le plus abondant est dessalifié par passage sur colonne de Sephadex G 15 et élution par l'acide acétique 0,1 M. Par chromatographie en couches minces de gel de silice et par électrophorèse, il donne une seule tache révélée à la ninhydrine. L'hydrolyse chlorhydrique libère de l'alanine, de l'acide glutamique et de l'acide diaminopimélique

* Nous avons effectué la purification des peptides monomères et dimères à l'Institut de Biochimie, Orsay. Nous remercions Monsieur le Professeur E. Lederer, Monsieur J.F. Petit et Madame J. Wietzerbin-Falszpan de l'aide qu'ils nous ont apportée.

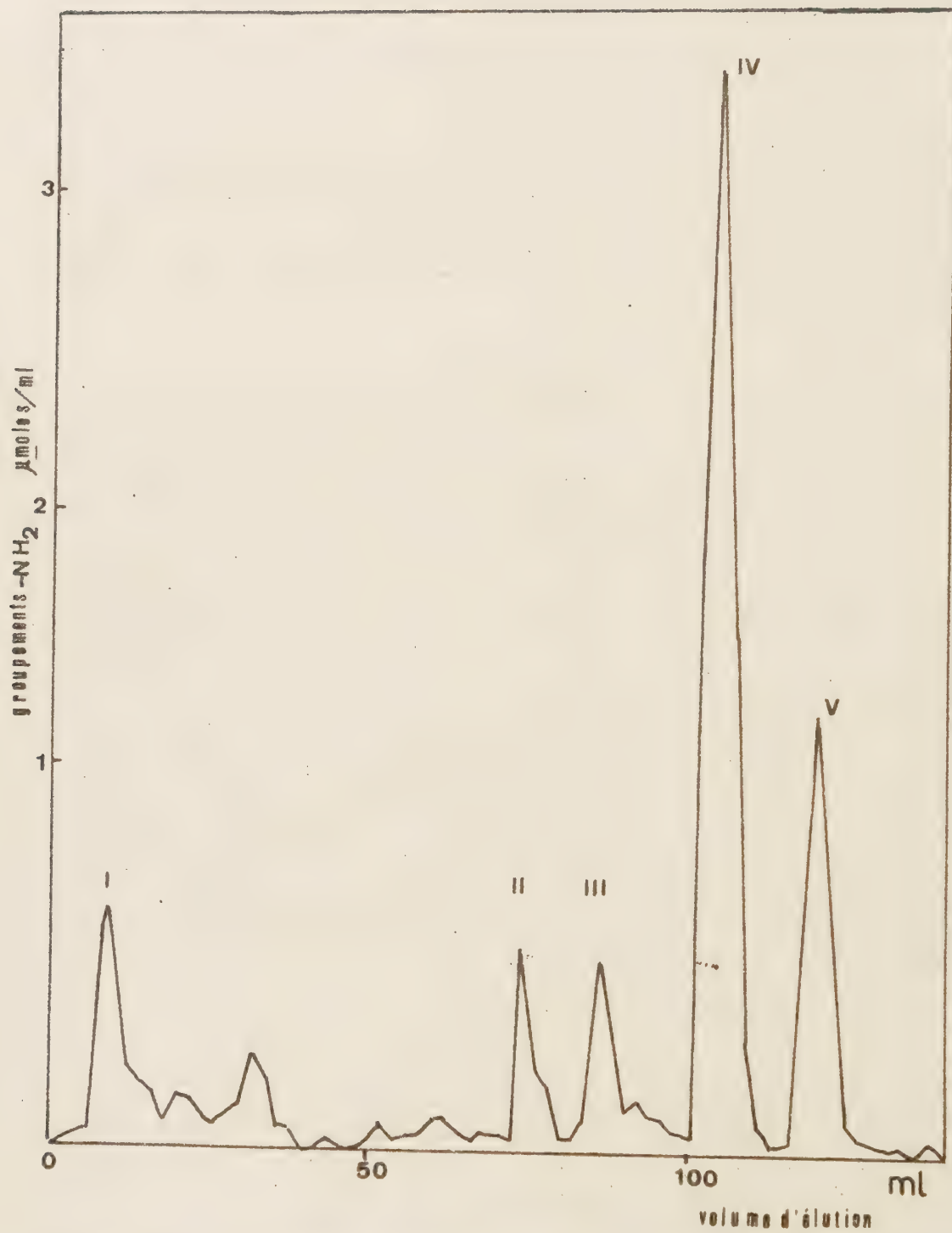


Figure 20. Fractionnement des peptides monomères sur colonne de résine cationique.

dans les rapports (2:1:1), il s'agit donc d'un tétrapeptide.

L'analyse des aminoacides N et C terminaux montre qu'une molécule d'alanine est C terminale et l'autre N terminale, l'acide diaminopimélique a également un groupement aminé libre. L'alanine N terminale possède la configuration L car elle est libérée par l'aminopeptidase isolée d'un filtrat de culture de Streptomyces albus (6)(126). L'enzyme libère une mole d'alanine par mole de peptide et dans le même temps apparaît une mole d'acide glutamique N terminal. Cette enzyme est active seulement sur les peptides dont les aminoacides N terminaux ont la configuration L et exige une amidation de la seconde fonction carboxyle de l'acide glutamique (26) (157). Les résultats sont résumés dans le tableau XVIII.

TABLEAU XVIII

Analyse des acides aminés du tétrapeptide.

	Composition en acides aminés	Acides aminés N terminaux	Acides aminés C terminaux
Ala	1,90	0,9	0,68 *
Glu	1,08		
DAP	1	0,78	

* Ce résultat est exprimé par rapport au "contrôle alanine" (voir partie expérimentale).

La composition en acides aminés est exprimée en moles par mole de DAP. Les valeurs des acides aminés N et C terminaux se rapportent à une mole de tétrapeptide, DAP est mono-N-terminal.

La mobilité du tétrapeptide soumis à une électrophorèse à pH 4,1 est comparée à celle du tétrapeptide de B. megaterium (13)(14) L Ala- γ -D Glu-meso DAP-D Ala et à celle du tétrapeptide monoamidé de C. welschii (36) : L Ala- γ -D Gln-LL DAP-D Ala*. On obtient les résultats suivants :

<u>B. megaterium</u>	mobilité	+ 0,4 cm
<u>C. welschii</u>	"	- 3,7 cm
<u>N. kirovani</u>	"	- 7,9 cm

* D Gln : acide glutamique monoamidé.

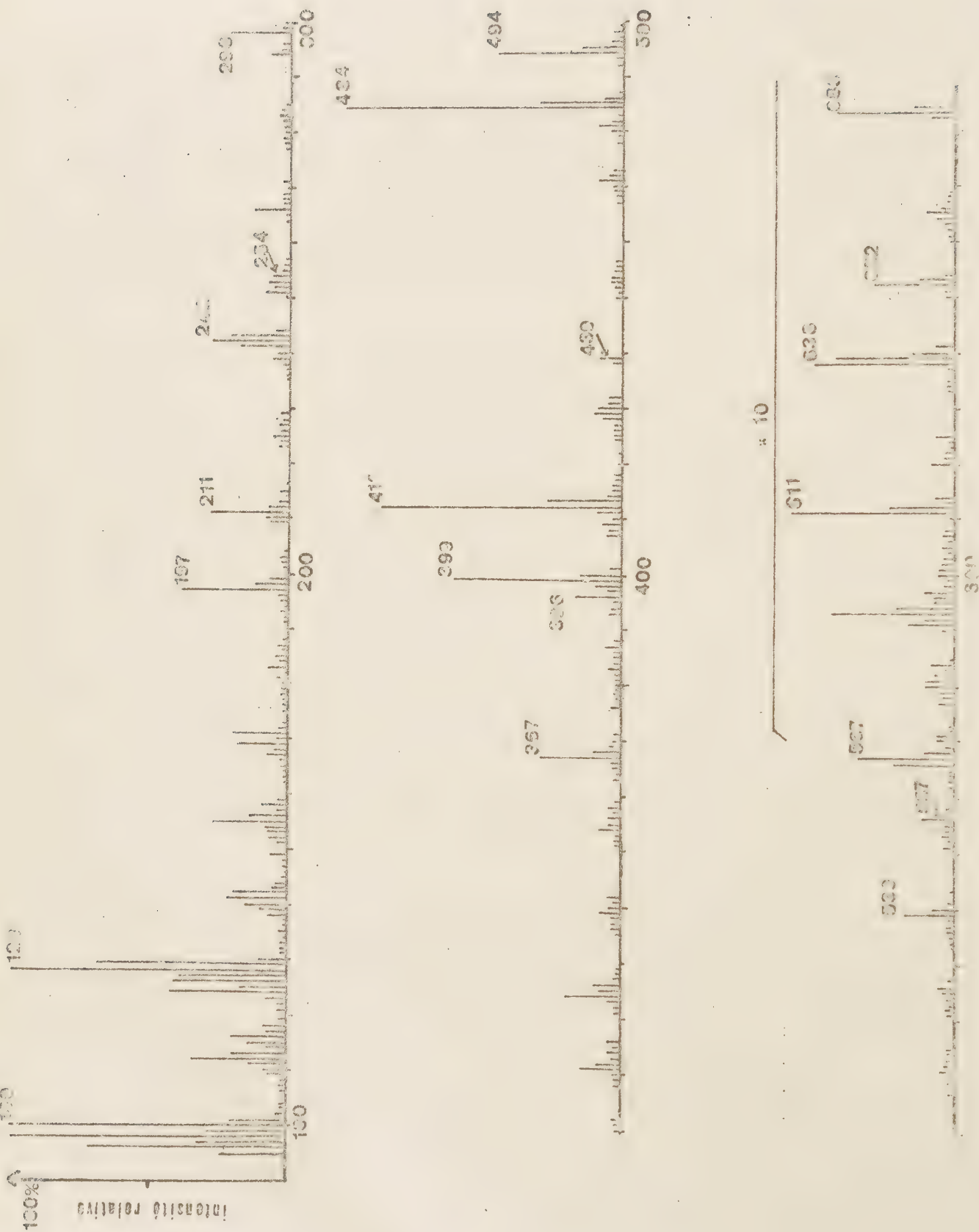


Figure 21. Spectre de masse du t-trapeptide acétylé et méthylé par ICH_3 .

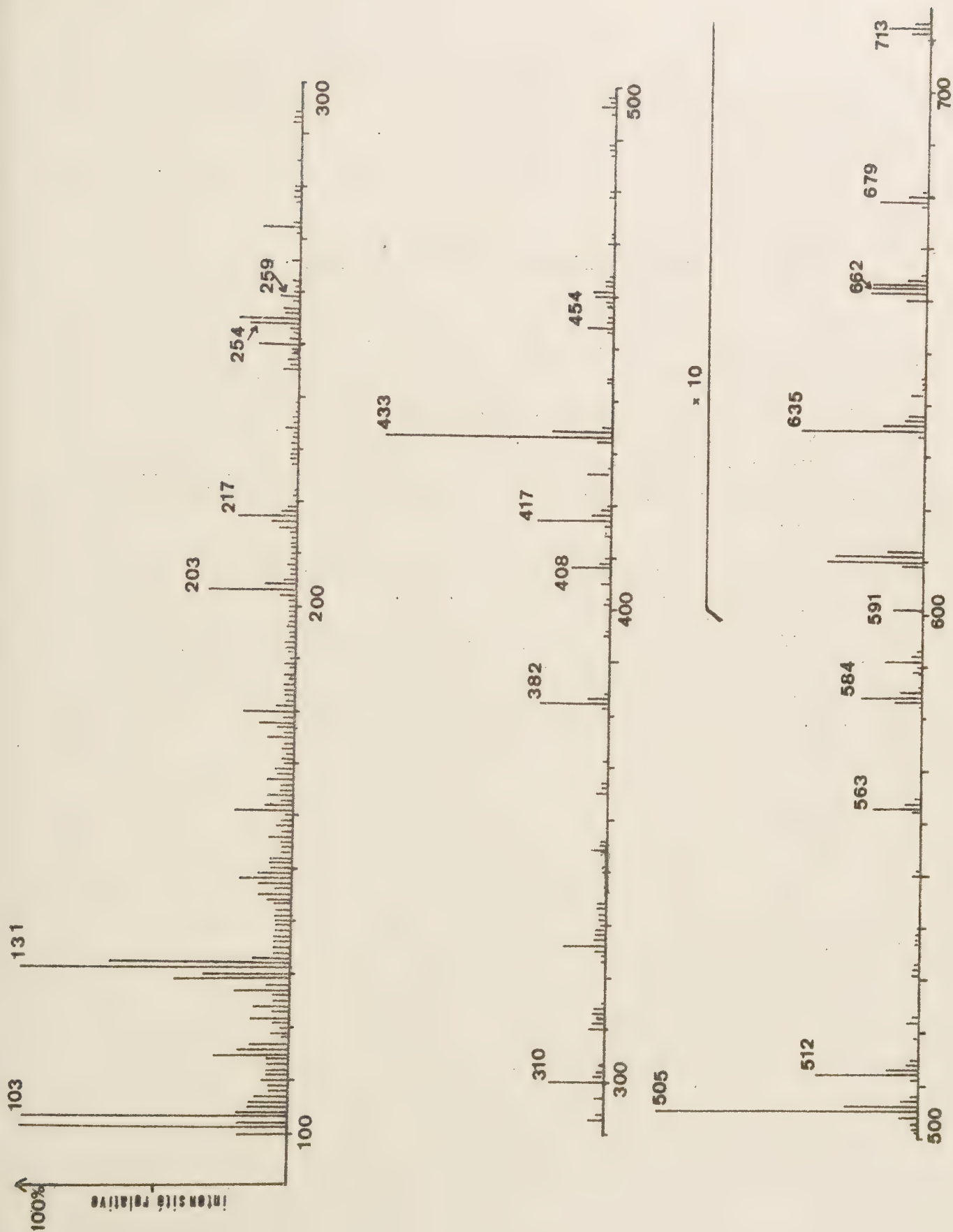


Figure 22. Spectre de masse du tétrapeptide acétylé et méthylé par ICD₃.

Les mobilités électrophorétiques du tétrapeptide de N.kirovani sont en faveur d'une diamidation des carboxyles de l'acide glutamique et du DAP non engagés dans les liaisons peptidiques.

Cette structure est confirmée par la spectrométrie de masse.

Etude du tétrapeptide par spectrométrie de masse.

Le tétrapeptide est acétylé puis méthylé suivant la méthode décrite par Hakomori (135) en utilisant soit ICH_3 , soit ICD_3 .

Le spectre du tétrapeptide acétylé et méthylé par ICH_3 est identique à ceux qui ont été obtenus par J. Wietzerbin-Falszpan et coll. pour les unités peptidiques isolées à partir de Mycobacterium smegmatis, Mycobacterium phlei, Mycobacterium tuberculosis BCG et Corynebacterium fermentans (32).

Les spectres des dérivés acétylés et perméthylés obtenus sont représentés figure 21 (p. 96) et figure 22 (p. 97).

Les ions moléculaires sont présents à $m/e = 683$ pour le spectre méthylé par ICH_3 et à $m/e = 713$ pour le spectre méthylé par ICD_3 .

Les principaux pics de fragmentations avec le nombre de groupements méthyles de ces pics et leur interprétation sont résumés dans la figure 23 (p. 99) et dans le tableau XIX (pages 100 et 101).

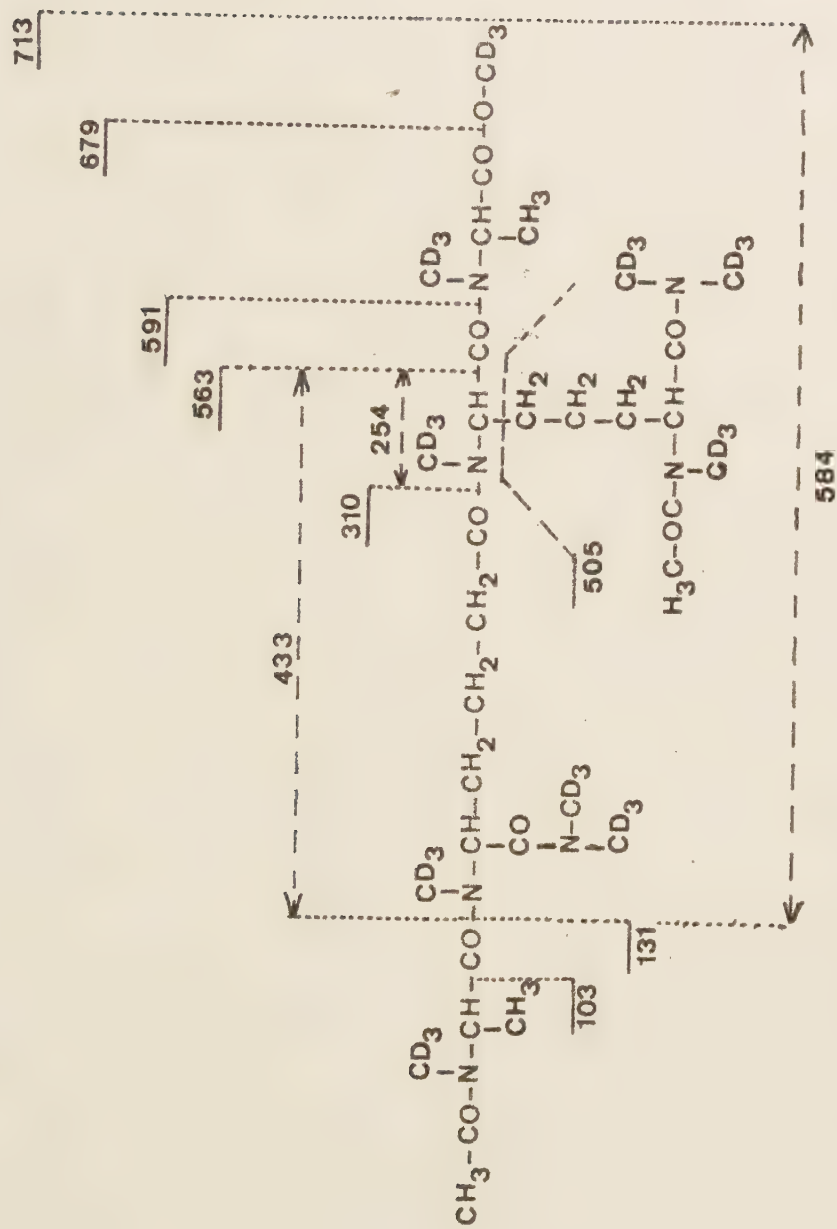


Figure 23. Fragmentations principales obtenues par spectrométrie de masse du tétrapeptide acétylé et méthylé par ICD₃.

TABLEAU XIX

Pics des fragmentations obtenues par spectrométrie de masse des dérivés acétylés et méthylés du térapeptide

N° du fragment	Spectre (ICH ₃) Fig. 21 m/e	Spectre (ICD ₃) Fig. 22 m/e	Différence de masse	Nombre de CH ₃ ou CD ₃	Interprétation
1	683	713	30	10	Pic moléculaire
2	652	679	27	9	Elimination de -OMe
3	638	662	24	8	Elimination de NHMe ₂
4	611	635	24	8	Elimination de -CONMe ₂
5	567	591	24	8	(AcMeAla-Me ₃ Gln-AcMe ₄ DAP) ⁺
6	557	584	27	9	(Me ₃ Gln-AcMe ₄ DAP-MeAlaOMe + 2H) ⁺
7	539	563	24	8	Elimination de (CO) à partir du fragment 5
8	494	512	18	6	Provient du fragment 7 (voir a)

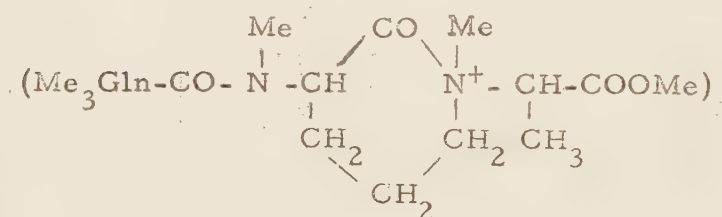
9	484	505	21	7	Elimination de la chaîne latérale du DAP
10	412	433	21	7	Elimination de AcMeAla à partir du fragment 7
11	399	417	18	6	Voir b
12	396	408	12	4	Voir c
13	367	382	15	5	Elimination de la chaîne latérale du DAP + (MeAlaOMe + H) ⁺
14	298	310	12	4	(AcMeAla-Me ₃ Gln) ⁺
15	242	254	12	4	Elimination de Me ₃ Gln à partir du fragment 10
16	211	217	6	2	(AcMeAla - N - C = CH ₂) Me CO ⁺
17	197	203	6	2	Voir d
18	128	131	3	1	(AcMeAla) ⁺
19	100	103	3	1	Elimination de (CO) à partir du fragment 18

a) Le pic à $m/e = 494$ ou 512 (fragment 8) provient du pic à $m/e = 539$ ou 563 (fragment 7) comme le montre le pic métastable présent à $452,7$ ou à $465,6$:

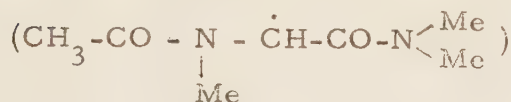
$$452,7^* = \frac{494^2}{539} \quad \text{ou} \quad 465,6^* = \frac{512^2}{563}$$

Cet ion correspond au départ de NHMe_2 à partir du fragment 7. Il peut également provenir du départ de (CO-MeAlaOMe) à partir du fragment 3.

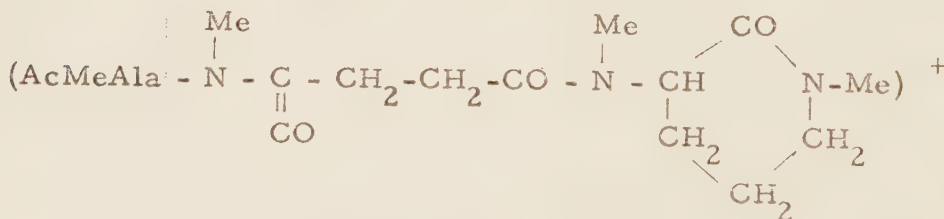
b) Le pic à $m/e = 399$ ou 417 (fragment 11) correspond à l'ion :



Il y a élimination de l'alanine N terminale et du fragment du DAP



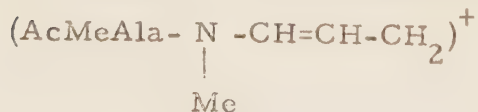
c) L'ion à $m/e = 396$ ou 408 (fragment 12) met en jeu 4 groupes méthyles, il peut provenir du fragment :



d) Le fragment $m/e = 197$ ou 203 (n°17) provient de l'ion 242 ou 254 (n°15) par élimination de NHMe_2 . Un pic métastable à $160,4$ ou à $162,2$ correspond à cette transition :

$$160,4^* = \frac{197^2}{242} \quad \text{ou} \quad 162,2^* = \frac{203^2}{254}$$

Le fragment 17 peut également correspondre à l'ion



Les deux spectres de masse des dérivés du tétrapeptide confirment la structure. Ils présentent les pics qui proviennent d'une dégradation progressive de la molécule, ce qui vérifie l'enchaînement peptidique (158). Il faut noter la présence du pic intense à $m/e = 484$ ou 505 qui correspond à l'élimination de la chaîne latérale du DAP $(-(CH_2)_3 - CH - CONMe_2)$



montrant ainsi que l'alanine C terminale et l'acide glutamique sont fixés sur le même carbone asymétrique du DAP. Ce détail de structure de l'unité peptidique a été démontré chez *E. coli* et *B. megaterium* par Van Heijenoort (14) en utilisant la dégradation d'Edman et récemment par Dezclée (152) par comparaison avec le tétrapeptide synthétique : L Ala- γ -D Glu-(L)meso DAP(L)-D Ala.

Les spectres de masse montrent également que les 2 carboxyles du Glu et du DAP non engagés dans les liaisons peptidiques sont amidifiés. La nature α ou γ du $-COOH$ de l'acide glutamique lié au DAP est également précisée.

Les travaux effectués par Van Heijenoort et coll. (159) montrent que les liaisons α donnent après coupure un pic inférieur à 28 unités de masse correspondant à la perte de CO , suivant le mécanisme :



Quand il y a une liaison γ la présence de groupements méthylènes empêche le déplacement de charge et l'élimination de CO .

Le pic à $m/e = 298$ ou 310 (fragment 14) qui correspond à la coupure de la liaison peptidique Glu-DAP n'est pas suivi du pic inférieur de 28 unités de masse, ce qui implique une liaison γ pour l'acide glutamique. Par contre les pics provenant des coupures des liaisons Ala-Glu et DAP-Ala comportent un pic inférieur de 28 unités de masse. Nous observons également des pics qui correspondent à la perte de $NHMe_2$ à partir du fragment $AcMeAla-Me_3Gln$ ($m/e = 298 - 45 = 254$, $m/e = 310 - 51 = 259$) et après l'élimination de la chaîne latérale du DAP ($m/e = 484 - 45 = 439$, $m/e = 505 - 51 = 454$). Ces pics de faible intensité mais significatifs correspondent à l'élimination de $-NH_3$ mentionnée par Shemyakin et coll. (160) dans le cas d'une liaison γ de l'acide glutamique. Les départs de $NHMe_2$ des fragments 3, 8, 17 s'effectuent à partir d'ions qui renferment Glu et DAP et ils ne peuvent être utilisés pour déterminer la nature de la liaison de l'acide glutamique. La nature γ du $COOH$ engagé dans la liaison peptidique sera également démontrée lors de l'étude du tripeptide.

Un seul point reste à préciser pour que la formule du tétrapeptide soit établie définitivement : la configuration optique D ou L du carbone portant le groupement NH_2 libre du DAP.

Pour établir cette configuration, nous avons dinitrophénylé le peptide et mesuré la rotation optique du mono-DNP-meso DAP obtenu après hydrolyse chlorhydrique. En effet la dinitrophénylation des acides aminés augmente leur rotation optique (161)(162) ce qui permet de déterminer leur configuration avec une faible quantité de matériel. En utilisant cette propriété, la configuration du carbone asymétrique du meso DAP porteur du $-\text{NH}_2$ libre de l'unité peptidique d'E.coli a été déterminée par Diringier et Jusic (163) et celle du peptide de B.megaterium par Bricas et coll. (13). Les rotations optiques moléculaires des dérivés di-DNP-LL DAP et mono-DNP-LL DAP préparés par Jusic et coll. (164) ont pour valeur respective $(M)_D = -444^\circ$ et -231° ($c = 0,2\%$ dans l'acide acétique), le dérivé mono-DNP-(D)-meso DAP synthétisé par Bricas et coll. (13) a une valeur de $(M)_D = +238^\circ$ ($c = 0,07$ dans l'acide acétique).

Le peptide monomère de N.kirovani après dinitrophénylation selon la méthode habituelle est hydrolysé par $\text{HCl } 6 \text{ N}$. Une première extraction à l'éther élimine la DNP-alanine puis le mono-DNP-meso-DAP est extrait au butanol saturé d'eau. Il est ensuite purifié par chromatographie sur papier. Le pouvoir rotatoire * mesuré au spectropolarimètre Perkin-Elmer a donné $(M)_D = +223^\circ$ ($c = 0,0383$ dans l'acide acétique). Cette valeur est donc en accord avec celle du mono-DNP-(D)-meso DAP et indique que le meso DAP de l'unité peptidique de N.kirovani a le carbone de configuration D porteur du groupement aminé libre et par conséquent que le $-\text{NH}_2$ engagé dans la liaison peptidique avec l'acide glutamique est situé sur le carbone L.

b) Etude du tripeptide.

Le pic V élué de la colonne de résine cationique (figure 20 p. 94) est constitué par le tripeptide diamidé : L Ala-D Gln-meso DAP(NH_2).

L'analyse des acides aminés par les DNP-dérivés donne DAP, Glu, Ala (1:1:1). Par chromatographie sur cellulose dans butanol-pyridine-acide acétique-eau (30:20:6:24) il donne une seule tache de $R_f 0,35$. Analysé par électrophorèse à pH 4,1 en présence du tétrapeptide dia-

* Cette mesure a été faite à l'Institut de Biochimie, Orsay dans le laboratoire de Monsieur E. Bricas.

midé, il présente une mobilité identique à ce dernier, ce qui indique une structure diamidée. On montre que l'acide aminé N terminal est l'alanine et que le meso DAP a également un groupement aminé libre. L'acide aminé C terminal n'a pas pu être déterminé par hydrazinolyse puisque l'un des carboxyles du meso DAP est amidifié. En effet, l'hydrazinolyse donne alors un DAP monohydrazide qui possède les caractères de solubilité des hydrazides des autres acides aminés et qui ne peut pas être identifié par son DNP-dérivé.

La dégradation d'Edman (156) permet de vérifier l'enchaînement des acides aminés. Les résultats sont indiqués dans le tableau XX.

TABLEAU XX

Analyse des acides aminés du tripeptide

	Composition en acides aminés	Acides aminés N terminaux
Ala	0,92	0,88
Glu	1,08	
DAP	1	0,76

La composition en acides aminés est exprimée en moles pour une mole de DAP. Les valeurs des acides aminés N terminaux se rapportent à une molécule de tétrapeptide, DAP est mono N terminal.

Nous avons d'autre part montré que l'acide glutamique est lié au DAP par son carboxyle γ .

Le tripeptide est désamidé par action de HCl 10 N à 25° pendant 30 heures (35) et purifié par électrophorèse. Une nouvelle électrophorèse (25 volts/cm, 2 heures) est effectuée à pH 4 en présence des 2 tripeptides synthétiques * L Ala- γ -D Glu-(L)-meso DAP et L Ala- α -D Glu-(L)-meso DAP (14). Le tripeptide désamidé isolé des parois de N.kirovani présente la même mobilité que le peptide L Ala- γ -D Glu-

* Nous remercions Monsieur P. Dezelée de l'Institut de Biochimie, Orsay, qui nous a procuré un échantillon des 2 peptides synthétiques.

(L)meso DAP.

Comme pour les parois de E.coli, le tripeptide doit provenir du tétrapeptide par départ de l'alanine C terminale sous l'action d'une enzyme autolytique (150)(151).

c) Etude des tétrapeptides et tripeptides monoamidés.

L'analyse des aminoacides des pics II et III élués de la colonne de résine (figure 20, p. 94) montre que le pic II est constitué d'un tétrapeptide (DAP 1, Glu 1, Ala 2) et le pic III d'un tripeptide (DAP 1, Glu 1, Ala 1).

Par chromatographie sur plaque de cellulose dans le solvant butanol-pyridine-acide acétique-eau (30:20:6:24) le pic II se révèle inséparable du tétrapeptide (pic IV) et le pic III inséparable du tripeptide (pic V). L'existence de groupements amidés est mise en évidence par électrophorèse à pH 4,1. En présence du tétrapeptide non amidé de B.megaterium (13)(14), du tétrapeptide monoamidé de C.welchii (36) et des tétrapeptide et tripeptide diamidés étudiés précédemment, les pics II et III possèdent la même mobilité que le tétrapeptide monoamidé de C.welchii (figure 24).

L'analyse des acides aminés terminaux montre que les deux peptides ont une molécule d'alanine N terminale, le meso DAP possède également un $-NH_2$ libre, le tétrapeptide a une molécule d'alanine C terminale. Ces résultats sont résumés dans le tableau XXI.

Le pic II est donc constitué par le tétrapeptide monoamidé et le pic III par le tripeptide monoamidé.

En comparant les résultats de l'électrophorèse des peptides monomères obtenus d'une part après digestion des parois P_C par le lysozyme et coupure du disaccharide peptide monomère par l'amidase et d'autre part après l'action de l'enzyme AL 1 de Myxobacter sur les parois P_D , on remarque que l'intensité de la tache correspondant aux peptides monoamidés est plus forte dans le second cas. L'action de l'acide chlorhydrique sur les parois P_C , indispensable pour qu'elles deviennent sensibles à l'enzyme provoque une désamidation partielle.

d) Etude du pic I.

Le pic I se comporte comme un produit hétérogène sur plaque de cellulose. Après hydrolyse chlorhydrique, il donne un mélange de leucine, valine, acide aspartique, thréonine, sérine, DAP, alanine et acide glutamique, ces deux derniers aminoacides étant les plus importants.

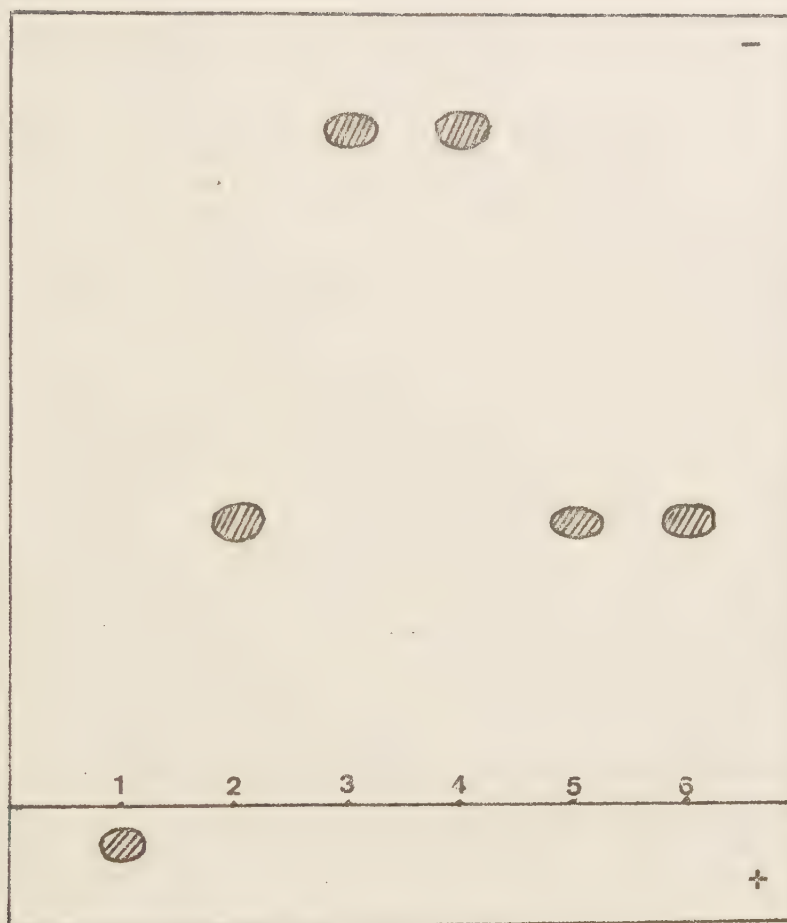


Figure 24. Electrophorèse à pH 4, 1 (appareil Biolyon).

- 1 - tétrapeptide non amidé de B. megaterium.
- 2 - tétrapeptide monoamidé de C. welchii.
- 3 - tétrapeptide diamidé de N. kirovani.
- 4 - tripeptide diamidé de N. kirovani.
- 5 - tétrapeptide monoamidé de N. kirovani.
- 6 - tripeptide monoamidé de N. kirovani.

TABLEAU XXI

Analyse des acides aminés des tétrapeptide et tripeptide monoamidés

		Composition en acides aminés	Acides aminés N terminaux *
Pic II	Ala	1,85	1,18
	Glu	1,10	
	DAP	1	1,08
Pic III	Ala	0,95	1,14
	Glu	1,05	
	DAP	1	1,08

* Les calculs ont été effectués en utilisant comme témoin le tétrapeptide diamidé (pic IV) analysé par la spectrométrie de masse. La composition en acides aminés est exprimée en moles pour une mole de DAP. Les valeurs des acides aminés N terminaux se rapportent à une mole de tétrapeptide ou de tripeptide, DAP est mono N terminal.

B. Peptides dimères.

Le peptide dimère obtenu après coupure du bis-disaccharide peptide dimère par l'amidase est purifié par chromatographie préparative sur papier.

Le peptide dimère provenant de l'action de l'enzyme de Myxobacter, obtenu en plus grande quantité, a été purifié par passage sur colonne de résine cationique PA 35 en utilisant des conditions analogues à celles du peptide monomère. Comme dans ce dernier cas, le premier pic renferme après hydrolyse les acides aminés "contaminants" du peptidoglycane : leucine, valine, acide aspartique, thréonine, sérine. Tous les autres pics donnent seulement alanine, acide glutamique et DAP après hydrolyse. La courbe d'élution est représentée figure 25. Elle est plus complexe que celle du peptide monomère.

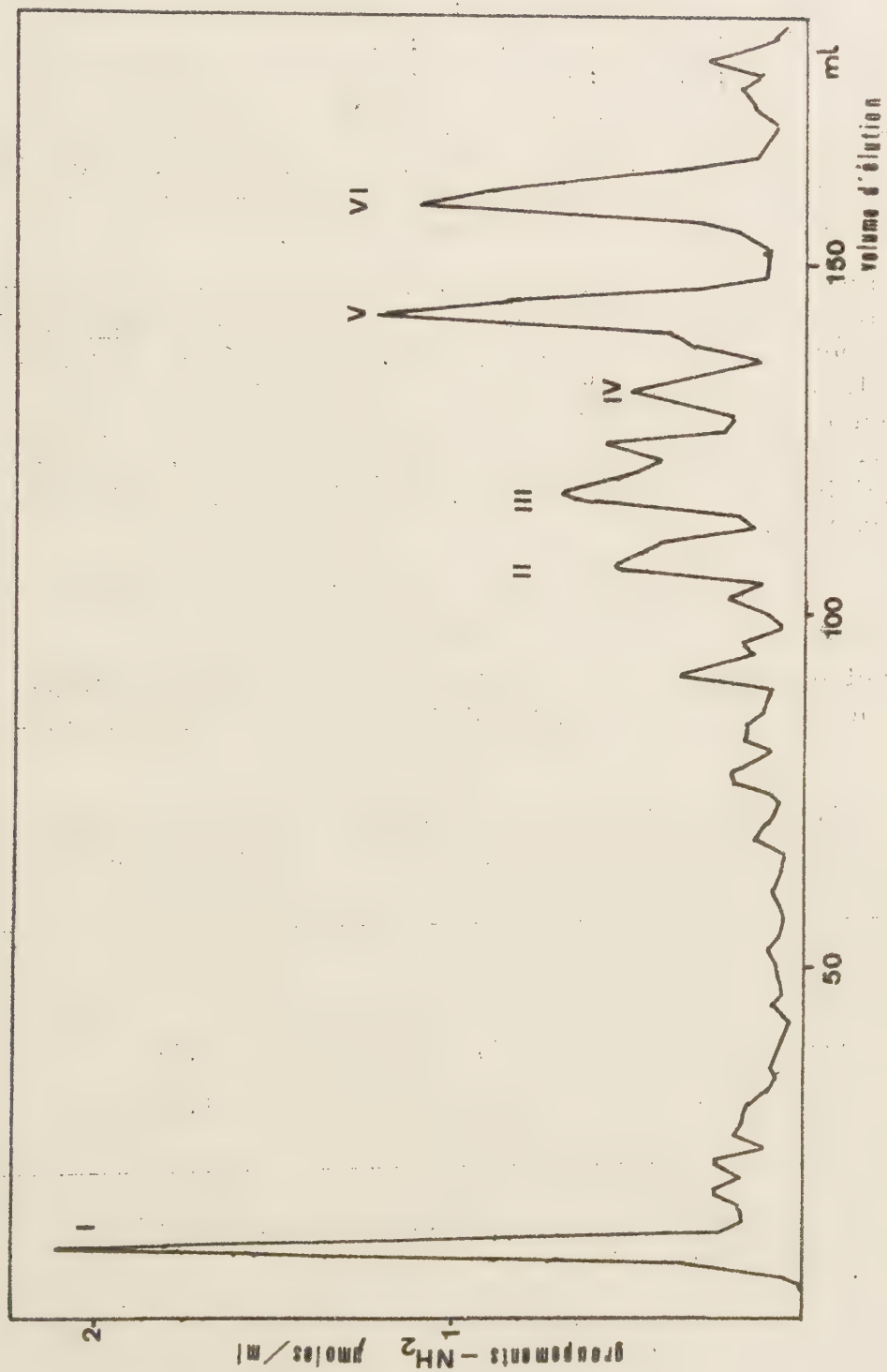


Figure 25. Fractionnement des peptides dimères sur colonne de résine cationique.

Les fractions V et VI les plus abondantes ont des Rf très proches par chromatographie ; elles possèdent la même mobilité par électrophorèse. La composition en acides aminés de ces deux fractions a été déterminée par la méthode de Moore et Stein avec l'autoanalyseur Technicon ; les rapports molaires sont les suivants :

Pic V DAP : 2, Glu : 1,95, Ala : 3,80

Pic VI DAP : 2, Glu : 1,90, Ala : 2,95

Le pic V est donc constitué d'un octapeptide (DAP 2, Glu 2, Ala 4) et le pic VI d'un heptapeptide (DAP 2, Glu 2, Ala 3). L'heptapeptide doit être formé par l'association d'un tétrapeptide et d'un tripeptide et l'octapeptide par l'association de deux tétrapeptides.

L'analyse des acides aminés N et C terminaux montre que deux molécules d'alanine sont N terminales et qu'une molécule de meso DAP possède également un groupement $-NH_2$ libre. Une molécule d'alanine est C terminale pour l'octapeptide. La recherche de l'acide aminé C terminal de l'heptapeptide n'a donné aucun résultat positif comme dans le cas du tripeptide diamidé, le carboxyle du meso DAP non engagé dans la liaison peptidique devant être amidifié. Ces résultats sont résumés dans le tableau XXII.

TABLEAU XXII

Analyse des acides aminés N et C terminaux des deux peptides dimères. Dosage du groupement $-NH_2$ du DAP libéré par action de la DD carboxypeptidase.

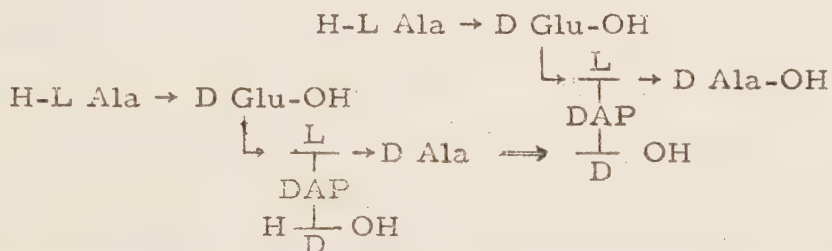
	Acides aminés N terminaux		Acides aminés C terminaux	DAP après action de la DD carboxypepti- dase.
	Ala	DAP	Ala	
Octapeptide	1,82	0,69	1,08	1,76
Heptapeptide	1,92	1,08		1,20

Les résultats sont exprimés pour une molécule de peptide dimère, DAP est mono N terminal.

Coupure enzymatique des deux peptides dimères.

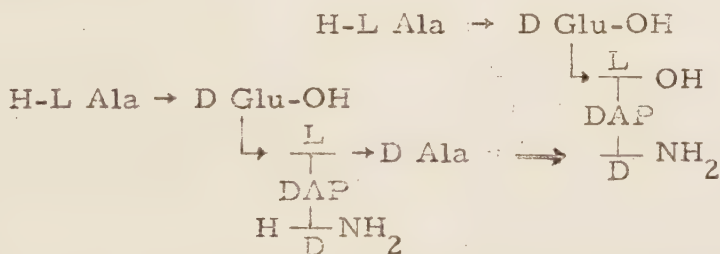
Les deux composés ont été soumis à l'action de la DD carboxypeptidase de Streptomyces albus G (165)(166). Cette enzyme hydrolyse la liaison terminale D-alanyl-D-alanine du nucléotide précurseur UDP-N-acétylmuramyl-L alanyl-D glutamyl-(L)-meso diaminopimétyl-(L)-D alanyl-D alanine ; l'énergie libérée par cette rupture est utilisée pour la réaction de transpeptidation conduisant au "cross-linkage" des peptides. La DD carboxypeptidase présente également une activité endopeptidasique et elle agit sur les liaisons interpeptidiques du type D-alanyl-D-aminoacide.

Le peptide dimère isolé des parois de E.coli (4) :



est un excellent substrat pour l'enzyme (activité spécifique 20.000 nanoéquivalents/mg/h)(166)

Par contre, l'heptapeptide isolé des parois cellulaires végétales de B.subtilis (35) :



est hydrolysé avec une vitesse beaucoup plus faible (activité spécifique 750 nanoéquivalents/mg/h).

L'incubation avec la DD carboxypeptidase * a été réalisée sur :

- l'octapeptide,
- l'heptapeptide,
- le peptide dimère obtenu par action de l'amidase et purifié par chromatographie sur papier.

* Ces essais ont été effectués au laboratoire de Microbiologie de l'Université de Liège par Madame M.Leyh-Bouille.

Chaque peptide est incubé pendant 6 heures à 37° en présence de DD carboxypeptidase en milieu tampon Tris 0,02 M pH 7,5 et 0,002 M en $MgCl_2$; l'hydrolyse de la liaison interpeptidique est suivie par chromatographie sur plaque de cellulose, électrophorèse et dosage du mono-DNP-dérivé du groupement aminé libéré du meso DAP.

L'enzyme hydrolyse totalement le dimère octapeptide en monomère tétrapeptide diamidé, ce qui montre que le dimère d'origine est tétraamidé, les $-COOH$ de l'acide glutamique et du meso DAP non engagés dans les liaisons peptidiques sont amidifiés. Il y a libération d'un groupement $-NH_2$ du meso DAP par molécule d'octapeptide (tableau XXII, p.110). La liaison interpeptidique entre les 2 unités de monomères se fait donc par l'intermédiaire du groupement aminé du carbone D du meso DAP et du carboxyle de la D-alanine terminale.

L'heptapeptide dimère, incubé dans les mêmes conditions que l'octapeptide, est beaucoup moins sensible à l'action de l'enzyme. Le dosage des groupements aminés du meso DAP libéré indique qu'il y a environ 10 à 15 % seulement de peptides monomères diamidés libérés par hydrolyse.

Ces résultats montrent l'influence de la D-alanine terminale, absente dans l'heptapeptide, sur l'activité enzymatique. Le peptide dimère obtenu après l'action de l'amidase n'est pas totalement hydrolysé (environ 60 %). Ce dimère contient un mélange d'octapeptide et d'heptapeptide, l'octapeptide est totalement hydrolysé et l'heptapeptide partiellement.

L'hydrolyse totale de l'octapeptide dimère et l'hydrolyse partielle de l'heptapeptide dimère par la DD carboxypeptidase permettent de montrer que les unités peptidiques adjacentes sont "cross-linkées" par une liaison peptidique entre le $-COOH$ de la D-alanine et le $-NH_2$ du carbone D du meso DAP.

Le peptidoglycane de N.kirovani appartient au type I de la classification proposée par Ghuysen (6).

Les autres fractions II, III, IV isolées après passage sur résine sont analysées par chromatographie et électrophorèse. Après hydrolyse chlorhydrique, seuls les acides aminés du peptidoglycane (Ala, Glu, DAP) ont été mis en évidence. Ces fractions sont constituées de peptides dimères, octapeptides et heptapeptides partiellement désamidés. La désamidation provient vraisemblablement de l'action de l'acide chlorhydrique sur les parois, action indispensable pour qu'elles deviennent sensibles à l'action de l'enzyme de Myxobacter.

C. Peptides trimères.

Les peptides trimères analysés par chromatographie sur plaque de cellulose dans le solvant : butanol-pyridine-acide acétique-eau (30:20:6:24) donnent une tache de Rf 0,095. L'analyse des acides aminés, effectuée après hydrolyse chlorhydrique et dosage par les DNP-dérivés, conduit aux rapports molaires suivants : DAP 3, Glu 3, Ala 5,1. Il y a 3 molécules d'alanine N terminale et une molécule de DAP qui a un groupement aminé libre. L'hydrazinolyse montre également que moins de une molécule d'alanine est C terminale.

Ces différents résultats sont résumés dans le tableau XXIII.

TABLEAU XXIII

Analyse des acides aminés des peptides trimères

	Composition en acides aminés	Acides aminés N terminaux	Acides aminés C terminaux
Ala	5,1	3,1	0,80
Glu	2,7		
DAP	3	1,1	

Les résultats sont exprimées en moles pour 3 moles de DAP prises comme unité. DAP est mono N terminal.

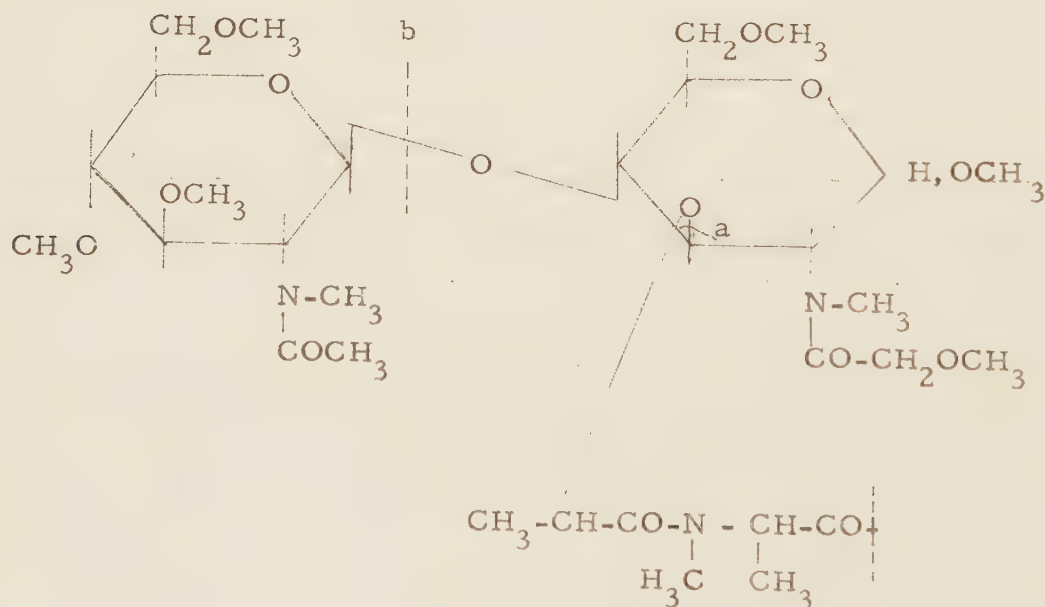
Ces résultats suggèrent que les peptides trimères doivent être constitués par un mélange de dodécapeptides et de undécapeptides, c'est-à-dire par l'association de 3 tétrapeptides monomères et par l'association de 2 tétrapeptides et de 1 tripeptide monomères.

D. Etude du disaccharide tétrapeptide par spectrométrie de masse.

La fraction du disaccharide peptide monomère obtenue après dégradation des parois par le lysozyme et filtration sur colonnes de Sephadex donne deux taches par chromatographie sur papier dans le solvant acide isobutyrique-ammoniaque 0,5 N (5:3). Elles correspondent au disaccharide tétrapeptide et au disaccharide tripeptide. Par chromatographie préparative on isole chacun des composés.

Le disaccharide tétrapeptide, le plus abondant, est purifié par passage sur colonne de Sephadex G 15 et élution par l'eau. Il est soumis à la spectrométrie de masse après perméthylation. Il donne le spectre représenté figure 26.

Le spectre présente les pics caractéristiques du disaccharide. En particulier, on note les pics à $m/e = 535$ provenant de la coupure selon a (formule 7) avec élimination de la partie lactyl-peptide et à $m/e = 260$ correspondant à la fragmentation de la liaison osidique selon b et formation de l'ion oxonium.



Formule 7

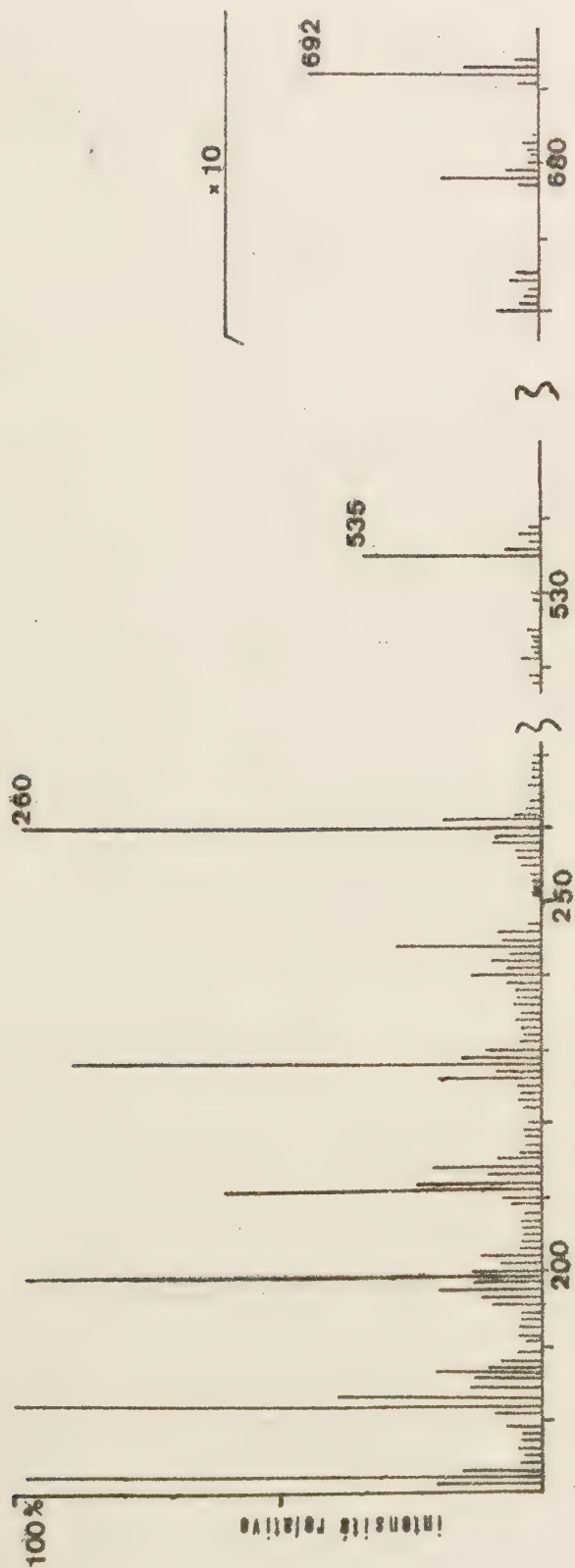
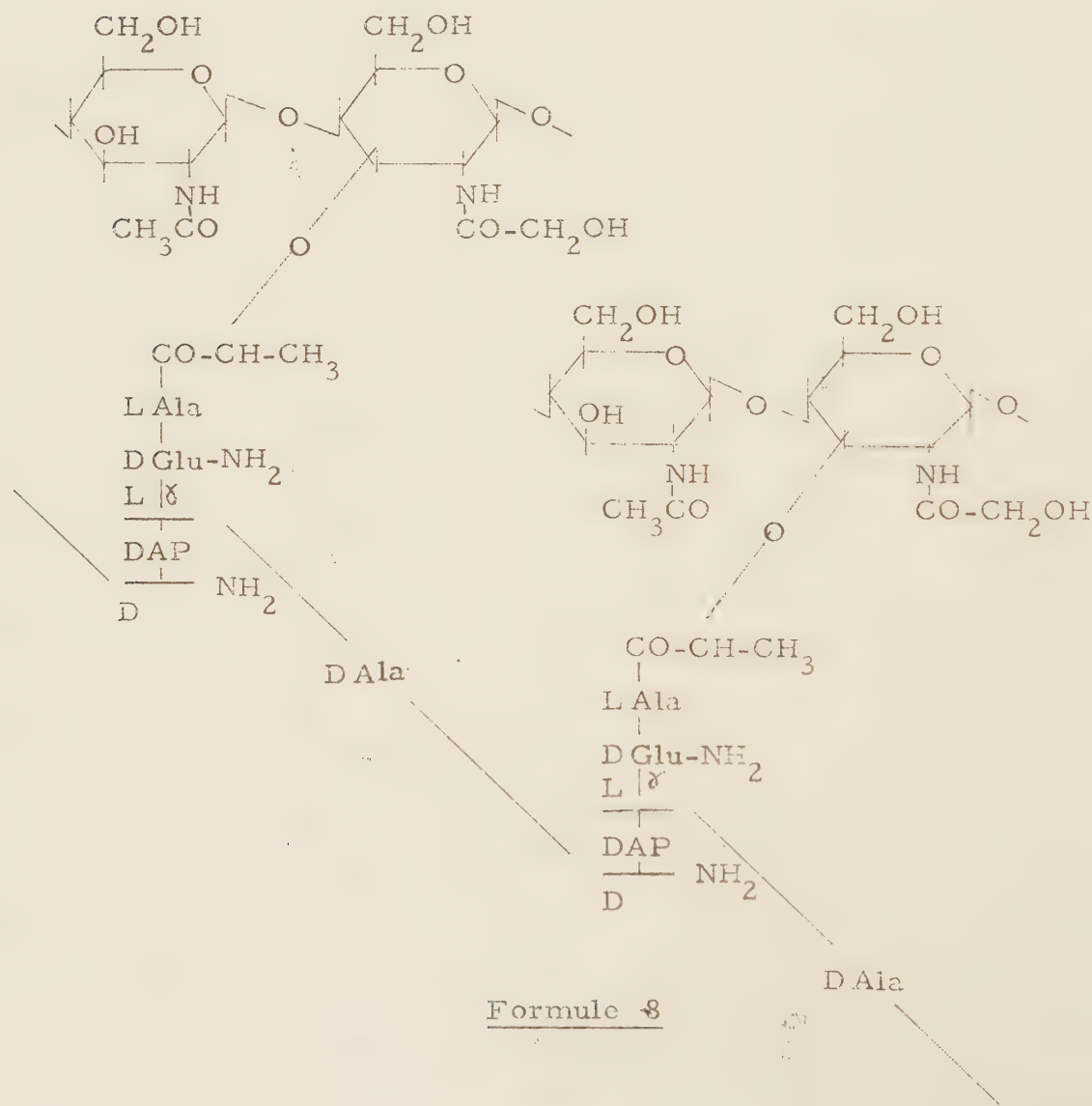


Figure 26. Spectre de masse du disaccharide tétrapeptide perméthylé.

Le pic le plus élevé du spectre est situé à $m/e = 692$. Il correspond au fragment disaccharidique auquel est lié l'alanine. La liaison amide entre l'acide lactique de l'acide N-glycolylmuramique et le groupement $-NH_2$ de l'alanine N terminale de la partie peptidique est ainsi directement mise en évidence.

L'existence de cette liaison dans les peptidoglycanes n'a jamais été démontrée directement, elle a toujours été admise implicitement comme la seule jonction possible entre la partie polysaccharidique et la partie peptidique.

L'ensemble des résultats permet d'écrire la formule du peptidoglycane de Nocardia kirovani (Formule 8) .



II. TECHNIQUES APPLIQUEES A L'ETUDE DES GLUCIDES

A. Dosage des sucres

1. Dosage des groupements réducteurs.

Nous avons utilisé une micro-méthode dérivée de celle de Park et Johnson (129). Dans cette technique la concentration en acide sulfurique du réactif contenant le sulfate de fer ammoniacal est augmentée jusqu'à 0,15 N afin de diminuer la tendance à la précipitation du complexe bleu lorsqu'il s'agit d'oligosaccharides.

Un échantillon correspondant à un pouvoir réducteur de 2 à 10 nanomoles de N-acétylglucosamine dans un volume de 200 μ l est additionné de 200 μ l d'un mélange (1:1) fraîchement préparé des réactifs suivants : ferricyanure de potassium 0,05 %, carbonate de sodium-cyanure de potassium 0,53 % et 0,065 %. Après agitation et chauffage à 100° dans un bain-marie pendant 15 minutes on ajoute 500 μ l du réactif renfermant le sulfate de fer ammoniacal (0,15 % + 3 ml de Brij à 35 % dans H₂SO₄ 0,15 N). Après homogénéisation l'intensité de la coloration est lue au bout de 15 minutes à 690 nm. Nous avons utilisé un spectrophotomètre Bausch et Long *.

Le coefficient d'extinction molaire déterminé expérimentalement pour la N-acétylglucosamine est de 90000. Le disaccharide, acide N-acétylglucosaminyl 1 $\rightarrow$ 4 N-acétylmuramique a un pouvoir réducteur équivalent à 1,5 fois celui de la N-acétylglucosamine (15). Le disaccharide, acide N-acétylglucosaminyl 1 $\rightarrow$ 4 glycolylmuramique possède un pouvoir réducteur équivalent.

2. Réaction de Morgan-Elson.

C'est une réaction spécifique des hexosamines N-acétylées. Nous avons utilisé la méthode mise au point par Ghuysen et coll. (120) qui est une micro-modification de celle de Reissig et coll. (143).

Réactif : 16 g de p-diméthylaminobenzaldéhyde sont dissous dans l'acide acétique glacial de manière à obtenir un volume total de 95 ml, on ajoute 5 ml d'acide chlorhydrique concentré. Ce réactif est dilué

* Je remercie Mademoiselle D. Gautheron, Professeur à l'Université de Lyon I, qui m'a permis d'utiliser cet appareil.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. PREPARATION DES PAROIS *

Les bacilles ont été cultivés à 37° sur milieu de Sauton (111) pendant une semaine ; ils sont recueillis par filtration et lavés plusieurs fois à l'eau distillée. Les parois sont préparées par désintégration ultrasonique à 0° pendant 15 minutes avec un désintégrateur M.S.E. 500 W. Chaque essai porte sur 25 g de bacilles (poids humide) mis en suspension dans 50 ml de tampon Tris 0,1 M pH 7,5 contenant du mercaptoéthanol (0,01 M), et du sulfate de magnésium (0,01 M). Les bactéries intactes sont éliminées par centrifugation à 1700 g pendant 10 minutes. Le culot est repris par 50 ml de tampon, soumis à nouveau à 15 minutes de sonication puis à 10 minutes de centrifugation. On recommence une troisième fois le cycle d'opérations. Les surnageants réunis sont à nouveau centrifugés 10 min. à 1700 g et le culot est éliminé. On centrifuge ensuite 20 minutes à 40000 g, le culot est lavé 3 fois par le tampon Tris puis soumis à un traitement à l'urée à 60 % pendant 4 heures à 37°. On centrifuge à nouveau à 40000 g et on lave 3 fois à l'eau distillée. Le culot est traité par la trypsine à 2 mg/ml dans le phosphate disodique M/30 pendant 5 heures à 37°. On centrifuge à 40000 g et on lave 3 fois. Le résidu lyophilisé constitue les parois brutes P_A.

Les centrifugations à faible vitesse ont été réalisées avec un appareil Jouan du type K 63 F ; les centrifugations à 40000 g avec un centrifugeur International.

Les parois brutes sont délipidées par extractions successives avec le mélange alcool-éther (1:1), chloroforme et chloroforme-méthanol (1:1).

* Je remercie Monsieur Mustapha Karahjoli pour son aide dans la préparation des parois.

avec de l'acide acétique glacial dans les proportions 1 à 8 au moment du dosage.

Dosage des sucres acétamidés. L'échantillon contenant l'équivalent d'environ 25 nanomoles de N-acétylglucosamine dans 125 μ l de tétraborate de potassium à 1 % est chauffé au bain-marie bouillant pendant 7 minutes s'il s'agit d'une N-acétylhexosamine ou 30 minutes s'il s'agit d'oligosaccharide. Pendant cette période de chauffage en milieu alcalin, il se forme un composé insaturé ; ce chromogène est capable de réagir avec le réactif de Morgan-Elson pour donner une coloration rouge (29) (141). Après refroidissement, on additionne 700 μ l de réactif dilué, le mélange est incubé à 37° pendant 20 minutes et l'intensité de la coloration est lue à 585 nm.

Le coefficient d'extinction molaire déterminé pour la N-acétylglucosamine est égal à 20000, pour le disaccharide de B.rettgeri (acide N-acétylglucosaminyl 1 $\rightarrow$ 4 N-acétylmuramique) $\epsilon_{585} = 7700$ (après 30 minutes de chauffage en milieu alcalin), pour le disaccharide de N.kirovani $\epsilon_{585} = 17000$ (après 30 minutes de chauffage en milieu alcalin).

Dosage des hexosamines. Les hexosamines sont acétylées puis dosées selon la méthode de Morgan-Elson (167).

L'échantillon contenant 20 à 100 nanomoles d'hexosamines est hydrolysé par 50 μ l d'HCl 3 N à 100° pendant 3 ou 4 heures en tube scellé. On hydrolyse dans les mêmes conditions des quantités déterminées de glucosamine. L'acide est éliminé par évaporation rapide sous vide en présence de potasse. Le résidu dissous dans 30 μ l d'eau est réacétylé par 10 μ l d'une solution d'anhydride acétique à 5 % en présence de 10 μ l d'une solution saturée de NaHCO_3 . La solution d'anhydride acétique est faite extemporanément en utilisant de l'eau refroidie à 0°. L'acétylation se fait en 10 minutes à température ordinaire, l'excès d'anhydride acétique est détruit par chauffage pendant 3 minutes au bain-marie bouillant. Après addition de 50 μ l de tétraborate à 5 % et chauffage pendant 7 minutes, 500 μ l d'acide acétique et 200 μ l de réactif de Morgan-Elson concentré sont ajoutés aux tubes refroidis. L'incubation à 37° dure 20 minutes comme dans le cas précédent. La lecture se fait également à 585 nm.

3. Dosage des hexoses.

Méthode au phénol. 25 à 50 nmoles d'oses sont mis en solution dans 100 μ l d'eau, on ajoute 100 μ l d'une solution de phénol à 5 % dans l'eau puis très rapidement 1 ml de H_2SO_4 concentré. Après agitation on lit immédiatement à 480 nm pour les pentoses et 492 nm pour les hexoses (130).

B. Réduction du disaccharide.

100 à 400 nmoles de disaccharide sont réduits par 3 μ l d'une solution aqueuse fraîchement préparée de NaBH_4 0,2 M (40). On laisse la réaction se poursuivre pendant 4 heures à température ordinaire, puis on ajoute 6 μ l d'acide acétique N. Après évaporation sous vide le résidu est repris par 50 μ l de méthanol absolu puis la solution est évaporée. Le traitement est répété 3 fois afin d'éliminer l'acide borique. Les résidus sont hydrolysés par HCl 3 N à 95° pendant 3 heures.

Les hexosamines résiduelles sont analysées par chromatographie sur papier et dosées par la réaction de Morgan-Elson. Quand la réaction a lieu avant l'oxydation periodique, on utilise 10 μ l d'une solution aqueuse de NaBH_4 0,2 M. Après réaction, le pH est amené à 5 à l'aide d'acide acétique 0,2 M et l'oxydation est effectuée normalement.

C. Hydrolyses alcalines en fonction du temps.

Nous avons utilisé la technique employée par Tipper et coll (15). Différents échantillons de 40 nmoles de disaccharide sont chauffés au bain-marie bouillant en présence de 30 μ l de tétraborate à 1 % en tube scellé. Après refroidissement on neutralise par 2 μ l de HCl 2N et après 10 minutes à température ordinaire on ajoute 2 μ l de NaOH 2 N et 2 μ l d'une solution fraîchement préparée de NaBH_4 0,2 M. On laisse la réduction s'effectuer de la manière ci-dessus. La glucosamine résiduelle est dosée après hydrolyse par la réaction de Morgan-Elson.

D. Oxydations periodiques.

Nous avons utilisé la technique de Tipper et coll. (15) et de Tipper et Strominger (168).

250 nmoles de disaccharide réduit sont traités par 9,7 μ l d'une solution de periodate de sodium 0,1 M dans un volume final de 100 μ l de tampon acétate 0,02 M pH 5. Après différents temps d'oxydation à température ordinaire et à l'obscurité, on effectue sur des fractions aliquotes le dosage du periodate consommé et du formol produit.

Dosage du periodate consommé. On prélève 7,12 μ l du milieu réactionnel, on ajoute 1 ml d'eau et la densité optique de la solution est mesurée à 224 nm. Le calcul est basé sur la différence à cette longueur d'onde entre les coefficients d'extinction molaires du periodate et de l'iodate (169). Pour chaque dosage on effectue en parallèle 2 essais témoins : un "standard periodate" qui contient la même quantité de periodate que l'échantillon à doser et un "standard iodate" qui contient la même quantité de periodate et 17,25 μ l d'éthylène glycol M/10.

Dosage du formol produit. Il est dosé par l'acide chromotropique selon la méthode de Suzuki et Strominger (170).

A 8,25 μ l du milieu réactionnel on ajoute 150 μ l d'arsénite de sodium M/5 pour réduire le periodate en excès, on laisse 15 minutes à température ambiante puis on additionne 750 μ l du réactif chromotropique. Ce réactif contient 200 mg de sel disodique de l'acide chromotropique dissous dans 20 ml d'eau et 80 ml d'acide sulfurique 24 N.

La coloration violette se développe pendant 30 minutes de bain-marie bouillant et la lecture est faite à 570 nm. Le témoin de formol est effectué en oxydant 17,25 μ l d'éthylène-glycol M/100 par la même quantité de periodate que l'échantillon (350 nmoles de formol, $\epsilon^{570} = 17500$).

E. Méthylation du disaccharide selon la méthode d'Hakomori.

Cette méthode décrite par Hakomori (135) utilise l'action catalytique du méthylsulfinylcarbanion de Corey (136). Elle permet une méthylation rapide et complète et a été utilisée par de nombreux auteurs pour l'étude des peptides et des polyosides méthylés par spectrométrie de masse (171)(172).

30 mg d'une suspension huileuse à 20 % d'hydruure de sodium sont extraits 3 fois par l'éther anhydre. On ajoute ensuite 200 μ l de diméthylsulfoxyde anhydre (distillé sous vide en présence d'hydruure de calcium). Le mélange est chauffé dans un bain d'huile à 80° pendant 5 minutes, puis additionné à 1 μ mole de disaccharide en solution dans 100 μ l de diméthylsulfoxyde. Après 15 minutes à température ordinaire, sous atmosphère d'azote, on ajoute un excès d'iodure de méthyle (400 μ l) et on laisse la réaction se poursuivre pendant 1 heure sous atmosphère d'azote. Le disaccharide perméthylé est extrait au chloroforme après avoir dilué le mélange réactionnel avec 300 μ l d'eau et 300 μ l de chloroforme.

Le disaccharide perméthylé est soumis à la spectrométrie de masse.

Le tétrapeptide diamidé et le disaccharide tétrapeptide ont été méthylés par la même méthode *.

* L'acétylation, la méthylation et les spectres de masse du tétrapeptide et du disaccharide tétrapeptide ont été effectués à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, 91 - Gif sur Yvette.

Les spectres de masse ont été effectués sur un appareil M S 9 (AEI). Je remercie Monsieur B.C.Das qui a effectué ces essais.

III. TECHNIQUES APPLIQUEES AUX ACIDES AMINES

A. Dosage des acides aminés totaux.

Dosage à l'analyseur "Technicon".

Un autoanalyseur "Technicon" a permis d'obtenir la composition qualitative et quantitative des acides aminés provenant de l'hydrolyse par HCl 6 N à 105 ° pendant 16 heures des différents lots de parois et de peptides.

La résine utilisée est du type chromobeads C 2 et les dosages spectrophotométriques sont réalisés à 570 nm. L'élution est faite avec un gradient de pH allant de 2,75 à 6,10, 2,4 M en Na⁺.

Le mélange déposé au sommet de la colonne doit contenir environ 250 nmoles de chaque acide aminé. Une solution de norleucine témoin (250 nmoles) est chargée en même temps et sert de référence aux différents dosages.

Dosage par les DNP-dérivés.

L'échantillon contenant environ 25 nmoles de chaque aminoacide est hydrolysé pendant 16 heures par 100 µl d'HCl 6 N à 105° en tube scellé. On hydrolyse dans les mêmes conditions un mélange standard de 25 nmoles d'acide glutamique, d'alanine et de DAP. Après évaporation de l'acide sous vide, les résidus sont repris par 100 µl d'eau, on ajoute 25 µl de tétraborate à 5 % ce qui donne un pH de 9,2 et 10 µl d'une solution alcoolique de dinitrofluorobenzène 0,1 M. La réaction de dinitrophénylation s'effectue à 60° pendant 30 minutes à l'obscurité. On additionne dans chaque tube 135 µl d'HCl 12 N et les DNP-aminoacides sont extraits une fois par 200 µl puis 2 fois par 100 µl d'éther. L'éther est évaporé sous un courant d'air chaud et les résidus repris par le méthanol sont déposés sur une plaque de gel de silice de 0,25 mm d'épaisseur. La plaque est développée à l'obscurité dans le solvant chloroforme-méthanol-acide acétique (88:10:2). Après séchage, chaque DNP-dérivé est recueilli et élué du gel de silice par agitation avec 1 ml du mélange éthanol-eau-ammoniaque (100:100:0,54). Après centrifugation les absorptions des solutions sont lues à 360 nm.

B. Dosage des groupements -NH₂ terminaux.

Dosage des groupements aminés libres totaux.

Ils sont dinitrophénylés selon la méthode décrite ci-dessus. Après réaction, on additionne 700 µl d'HCl 3 N et l'absorption est lue à 420 nm. A ce pH et à cette longueur d'onde, le dinitrophénol qui provient de la décomposition du réactif en excès a une absorption négligeable par

rapport aux DNP-dérivés des acides aminés. Un acide aminé témoin est traité dans les mêmes conditions.

Cette technique est utilisée pour analyser les groupements aminés libres lors des fractionnements sur colonnes, ce qui permet de localiser les peptides à la sortie des colonnes. Lorsque l'éluant est l'acide acétique 0,1 M, l'échantillon est neutralisé au préalable par la soude 0,1 M.

Dosage de chaque groupement aminé terminal.

Au peptide qui renferme 25 à 50 nanoéquivalents de chaque groupement -NH_2 terminal en solution dans 100 μl d'eau, on ajoute 16 μl de triéthylamine à 10 % dans l'éthanol et 50 μl de dinitrofluorobenzène 0,1 M dans l'éthanol. On met à 60° pendant 30 minutes puis les échantillons et les aminoacides témoins sont séchés sous vide. Les résidus sont hydrolysés par 200 μl d'HCl 6 N à 105° pendant 15 heures en tube scellé. Les DNP-dérivés des acides aminés libérés par hydrolyse sont extraits à l'éther, séparés sur plaque de gel de silice et dosés comme précédemment. Les mono-DNP-dérivés des acides diamminés (mono-DNP-meso DAP dans le cas présent) ne sont pas extraits à l'éther dans ces conditions ; la concentration en HCl est amenée à 3 N par addition de 200 μl d'eau et le mono-DNP-meso DAP est extrait par le butanol saturé d'eau. Les extraits butanoliques sont concentrés sous vide, déposés sur plaque de gel de silice et élués avec le solvant chloroforme-méthanol-acide acétique-eau (65:25:13:8). Une quantité connue (50 nmoles) de mono-DNP-DAP est hydrolysée par HCl 6 N et traitée dans les mêmes conditions. Après migration, les taches jaunes de mono-DNP-DAP sont recueillies et dosées comme précédemment.

C. Dosage des groupements -COOH terminaux.

Il se fait par hydrazinolyse. L'hydrazine agit sur les peptides en coupant les liaisons amides -CO-NH- , il y a formation d'hydrazides de tous les acides aminés qui ont leur carboxyle engagé dans une liaison amide, seul l'acide aminé C terminal reste inchangé. Il est mis en évidence et dosé par son DNP-dérivé.

Le peptide sec (50 à 100 nmoles) est traité par 100 μl d'hydrazine anhydre. Les tubes sont scellés et maintenus à 80° pendant 20 heures. Cette première étape doit être effectuée en milieu rigoureusement anhydre. L'hydrazine est évaporée sous vide en présence de H_2SO_4 . Au résidu repris par 200 μl d'eau on ajoute 100 μl de benzaldéhyde fraîchement redistillé. Les tubes scellés sont agités vigoureusement toutes les 5 minutes pendant 1 heure. Après centrifugation la phase aqueuse est recueillie et traitée à nouveau par 75 μl de benzaldéhyde

comme précédemment. La nouvelle phase aqueuse recueillie est extraite à l'éther et une fraction aliquote de cette phase aqueuse est utilisée pour un dosage des acides aminés libres par la méthode des DNP-dérivés.

Des acides aminés ou des peptides de structure connue servent de contrôle. Par rapport au contrôle d'alanine, la récupération en acide aminé C terminal obtenue par hydrazinolyse d'un peptide est environ 60 à 70 % ; par rapport au contrôle peptidique, les valeurs obtenues correspondent à une récupération de 100 %.

D. Dosage des acides aminés après hydrolyse alcaline.

La présence de pyridine dans le gradient éluant lors du passage des peptides sur colonne de résine cationique ne permet pas un dosage par la méthode des DNP-dérivés.

A la sortie de la colonne l'échantillon prélevé (25 μ l) est hydrolysé par 200 μ l de NaOH 2,5 N à 100° pendant 2 heures 30. L'addition de 1 ml d'acide acétique à 30 % neutralise la soude et ramène le pH à 5. Le dosage colorimétrique à la ninhydrine est effectué selon Moore et Stein (155).

Réactif : 1 ml de réactif contient 20 mg de ninhydrine et 3 mg d'hydrindantine dissous dans 0,75 ml de méthylcellosolve et 0,25 ml d'une solution aqueuse d'acétate de sodium 4 M pH 5,5.

Dosage : après addition de 0,2 ml de réactif et chauffage pendant 15 minutes au bain-marie bouillant, chaque fraction est diluée avec 1 ml d'alcool à 50 % et la coloration obtenue est lue à 570 nm. Un tube témoin avec 50 nmoles d'alanine est dosé parallèlement.

E. Dégradation des peptides selon la réaction d'Edman.

Nous avons utilisé la technique mise au point pour des micro-quantités par Gray et Smith (156).

La réaction est effectuée sur 5 à 10 nmoles de peptides par cycle de dégradation. Chaque échantillon est additionné de 50 μ l du mélange fraîchement préparé : phénylisothiocyanate 30 μ l, pyridine 600 μ l, eau 400 μ l et maintenu à 50° pendant 45 minutes. Après séchage sous vide à 70°, la cyclisation est effectuée par 50 μ l d'acide trifluoroacétique anhydre pendant 10 minutes puis l'acide est éliminé sous vide. Sur l'un des échantillons on effectue deux dégradations successives.

Après la réaction, tous les échantillons en solution dans 50 μ l d'eau sont extraits par 3 fois 200 μ l d'acétate d'éthyle puis séchés sous vide. On ajoute 15 μ l de NaHCO_3 0,2 M puis on sèche sous vide,

on reprend par 15 μ l d'eau et le pH est ajusté à 7,5-8 par addition de NaHCO_3 . On ajoute alors 15 μ l d'une solution de chlorure de dansyle à 3 mg/ml dans l'acétone. La réaction de dansylation s'effectue à 50° pendant 15 minutes. Les échantillons séchés sous vide sont hydrolysés par 100 μ l de HCl 6 N à 105° pendant 16 heures. Après élimination de HCl les dérivés dansylés des aminoacides sont extraits par l'acétate d'éthyle, ils sont caractérisés par chromatographie en couches minces de gel de silice dans le solvant benzène-pyridine-acide acétique (80:20:2) en présence des dérivés dansylés des aminoacides témoins ; ils donnent des taches fluorescentes en ultra-violet.

IV. TECHNIQUES DIVERSES

A. Dosage du phosphore.

Nous avons utilisé la technique de Lowry et coll. (173). L'échantillon contenant 20 à 60 nmoles de phosphore (dans 100 μ l d'eau au maximum) est minéralisé par 100 μ l de la solution suivante :

acide sulfurique concentré	30,6 ml
acide perchlorique à 70 %	6,7 ml
H_2O q.s.p.	100 ml

Le mélange est porté pendant une heure à 100° puis 2 heures à 165°. Si la minéralisation n'est pas complète, on ajoute 5 μ l d'acide nitrique concentré et le chauffage est prolongé encore une demi-heure. Les tubes sont refroidis et on ajoute 1 ml de réactif fraîchement préparé à partir de 9 ml d'une solution A et de 1 ml d'une solution B.

La solution A comprend :

- 1 ml d'acétate de sodium M
- 1 ml de molybdate d'ammonium à 2,5 %
- 7 ml d'eau.

La solution B est une solution d'acide ascorbique à 10 %.

On laisse incuber 90 minutes à 38° et l'intensité de la coloration est lue à 700 nm. Une gamme étalon est effectuée dans les mêmes conditions.

B. Préparation du mono-DNP-meso DAP pour la mesure du pouvoir rotatoire.

Il a été préparé à partir du peptide monomère. A 4 μ moles de peptides on ajoute 2,5 ml de tétraborate à 1 % et 0,3 ml d'une solution alcoolique 0,1 M de dinitrofluorobenzène. Le mélange est maintenu à 60° pendant une demi-heure. On additionne 2,8 ml de HCl 12 N et

on hydrolyse à 105° pendant 16 heures en tube scellé.

Le dinitrophénol et la DNP-alanine sont extraits à l'éther. La normalité de la solution est amenée à 3 N en HCl et le mono-DNP-meso-DAP est extrait au butanol saturé d'eau jusqu'à ce que la solution résiduelle devienne incolore. Le butanol est évaporé sous vide. Le dérivé obtenu est purifié par chromatographie sur papier Whatman n° 1 en employant le solvant butanol-acide acétique-eau (4:1:5) et en utilisant un témoin de mono-DNP-DAP. La bande colorée est découpée et éluée par le mélange éthanol-eau-ammoniaque (100:100:0,54). Après évaporation le produit est dissout dans HCl N, on effectue une extraction à l'éther puis au butanol saturé d'eau. L'extrait butanolique est à nouveau concentré sous vide. On récupère 1,60 μ mole de mono-DNP-meso DAP qui donne un pouvoir rotatoire moléculaire $(M)_D = 223^\circ$ ($c = 0,0383$ dans l'acide acétique glacial).

C. Fractionnement sur colonne.

Colonnes de Sephadex.

Les colonnes de Sephadex G 50 et G 25 sont montées en série. Chaque colonne est caractérisée par le volume d'élution d'une substance à haut poids moléculaire exclue du gel (volume mort V_0) et le volume d'élution d'un sel (V_i). Pour chaque composé le coefficient de distribution est donné par la formule :

$$K_D = \frac{V_e - V_0}{V_i - V_0}$$

V_e étant le volume d'élution de la substance.

Les gels peuvent être équilibrés avec de l'eau, avec des solutions salines (LiCl 0,1 M par exemple) ou des solutions acides (CH_3COOH 0,1 M). L'élution est effectuée avec les mêmes liquides. Les éluants autres que l'eau sont utilisés pour obtenir des pics plus étroits et réduire les interactions possibles entre le gel et les substances à séparer.

Colonne de résine cationique.

La résine employée pour la purification des peptides est la résine sulfonée Beckman PA 35. La colonne (diamètre 1 cm, hauteur de résine 7 cm) est maintenue à 50°. La séparation est effectuée sur 10 μ moles de peptides dissous dans 2 ml d'eau ; le pH est amené à 2,5 à l'aide d'acide formique. La solution est déposée au sommet de la colonne et l'élution est réalisée par un gradient linéaire effectué avec 300 ml de tampon pyridine-acide acétique pH 3,1, 0,2 M en pyridine et 300 ml de tampon pyridine-acide acétique pH 5,1 0,2 M en pyridine. Des

fractions de 1 ml sont recueillies et une partie aliquote (25 μ l) des fractions paires est dosée par la ninhydrine après hydrolyse alcaline.

D. Chromatographies et électrophorèses.

Les chromatographies sur papier sont effectuées sur papier Whatman n° 1 ; pour les chromatographies préparatives le papier Whatman n° 3 MM a parfois été utilisé.

Les chromatographies sur plaques ont été réalisées soit avec la poudre de cellulose (MN 300 G), soit avec le gel de silice G.

Les solvants les plus fréquemment utilisés sont :

- butanol-n-pyridine-acide acétique-eau (30:20:6:24)
- acide isobutyrique-ammoniaque 0,5 N (5:3)
- butanol-n-acide acétique-eau (5:1:2)

Les groupements aminés sont révélés par vaporisation d'une solution de ninhydrine préparée selon Russel (174) en mélangeant extemporanément des volumes égaux d'une solution de 330 mg de ninhydrine dans 100 ml de butanol tertiaire et d'un mélange acide acétique-eau-pyridine (1:5:5) puis chauffage à 110° pendant 10 minutes.

Les sucres ont été mis en évidence par le malonate d'aniline en solution dans le méthanol (175).

Les hexosamines et les oligosaccharides sont décelés sur papier par fluorescence U.V. après avoir plongé le chromatogramme dans le réactif de Sharon (133) (solution de soude 0,5 N dans éthanol-propanol 6:4) et séchage à 120° . Ce réactif est spécifique des hexosamines N-acétylées. Il faut noter que l'acide N-glycolylmuramique réagit plus faiblement et donne un spot beaucoup moins fluorescent que la N-acétylglucosamine révélée dans les mêmes conditions.

Les électrophorèses ont été faites sur papier Whatman 3 MM avec un appareil Biolyon ou avec un appareil Pherograph. Le tampon le plus utilisé, de pH 4,1 comprend le mélange pyridine-acide acétique-eau (2,5:9:1000).

RESUME ET CONCLUSIONS

Nous avons démontré la structure de la paroi d'une souche de *Nocardia* : N. kirovani. Le constituant essentiel est un peptidoglycane, composé commun à toutes les parois bactériennes, accompagné d'une fraction lipidique importante et d'un polysaccharide.

Les lipides, étudiés à partir des bactéries entières et retrouvés dans les parois, comprennent essentiellement : des acides nocardiques avec, en quantités plus faibles, des nocardones, des triglycérides et des pigments rouge orangé de nature caroténoïdique. Nous avons démontré la structure du composé principal de la fraction pigmentée, il s'agit du palmitate de phlei-xanthophylle accompagné d'autres esters en C_{12} , C_{14} et C_{18} de phlei-xanthophylle et de 4-céto- phlei-xanthophylle.

Les acides nocardiques sont tri et tétraéthyléniques avec une chaîne latérale saturée et possèdent une taille supérieure à ceux qui ont été trouvés jusqu'ici dans d'autres espèces de *Nocardia*, ils se situent entre $C_{58}H_{110}O_3$ et $C_{66}H_{124}O_3$. Les nocardones possèdent des masses moléculaires analogues et des insaturations identiques à celles des acides nocardiques, leurs formules vont de $C_{57}H_{106}O$ à $C_{63}H_{118}O$.

Deux groupes de triglycérides ont été trouvés. Dans le premier groupe, les constituants sont les acides gras habituels en C_{14} , C_{16} et C_{18} . Dans le deuxième groupe nous avons mis en évidence, à côté de ces acides, des acides gras de haut poids moléculaire polyéthyléniques à nombre impair d'atomes de carbone en C_{35} , C_{37} , C_{39} et C_{41} . Il faut noter que la présence d'acides impairs de haut poids moléculaire à chaîne non ramifiée est inhabituelle dans les lipides naturels.

Le peptidoglycane possède les caractères structuraux communs à toutes les bactéries c'est-à-dire qu'il est formé de deux hexosamines régulièrement alternées liées par des liaisons β 1 $\rightarrow$ 4. Dans la plupart des bactéries il s'agit de la N-acétylglucosamine et de l'acide N-acétylmuramique, ce dernier composé est remplacé par l'acide N-glycolylmuramique dans le peptidoglycane de *Nocardia kirovani*, cette particularité n'avait été trouvée jusqu'à présent que dans le peptidoglycane des mycobactéries (18)(19). L'acide N-glycolylmuramique est substitué par des tétrapeptides diamidés L Ala- γ -D Gln-(L)-mesoDAP (D)-NH₂ (L)-D Ala et par des tripeptides diamidés L Ala- γ -D Gln-(L)-mesoDAP (D)-NH₂. Certaines de ces unités sont reliées entre elles par des ponts interpeptidiques directs entre le carboxyle de la D alanine et le groupement aminé (D) de l'acide meso-diaminopimélique. La coupure enzymatique du peptidoglycane par le lysozyme et par l'enzyme AL 1 de Myxobacter a permis d'obtenir des fragments disaccharidiques, des peptides et des glycopeptides. Nous avons

isolé les tripeptides, tétrapeptides, peptides dimères : octa et heptapeptides, disaccharide, disaccharides monomères, bisdisaccharides dimères etc... et nous avons démontré la structure de ces composés. Il faut préciser que la spectrométrie de masse a été très largement utilisée tant pour l'étude structurale du peptidoglycane que pour celle des lipides.

Le disaccharide présente une réaction de Morgan-Elson anormalement intense, ce qui nous a conduit à préciser la nature de la liaison entre les deux osamines et plus particulièrement à étudier l'action du periodate sur le dérivé glycolylé de l'acide muramique. Un mécanisme d'action de cet oxydant a été proposé.

Le peptidoglycane appartient au type I de la classification proposée par Ghuysen (6) c'est-à-dire que l'acide diaminé est l'acide meso-diaminopimélique. A ce type structural se rattachent les peptidoglycane d'E.coli, B.megaterium, B.subtilis et celui des mycobactéries. La parenté du peptidoglycane de N.kirovani est cependant plus étroite avec celui des mycobactéries en raison de la présence dans ces deux genres seulement d'acide N-glycolylmuramique au lieu d'acide N-acétylmuramique. La partie peptidique formée d'unités tétrapeptidiques diamidées a été également retrouvée chez Corynebacterium diphtheriae (30) et Corynebacterium fermentans (32) mais chez les corynebactéries l'acide muramique est N-acétylé comme dans la majorité des autres bactéries.

A côté des lipides et du peptidoglycane la paroi de N.kirovani renferme une fraction polyosidique. L'hydrolyse de la paroi libre en effet du galactose et de l'arabinose et il est vraisemblable que ces sucres appartiennent à un arabinogalactane comme dans le cas des mycobactéries.

L'organisation de la paroi de N.kirovani et plus généralement du genre Nocardia est donc extrêmement complexe. Les conclusions apportées à l'espèce étudiée peuvent être généralisées pour d'autres espèces de Nocardia : N.asteroides, N.caviae renferment en effet les mêmes constituants pariétaux que N.kirovani (176).

On peut envisager pour la paroi des Nocardia une structure du même type que celle des mycobactéries proposée récemment par E.Lederer (177). Le peptidoglycane serait lié au polyoside soit par l'intermédiaire de groupements phosphates fixés sur l'acide N-glycolylmuramique, soit directement par des liaisons osidiques entre le polyoside et la chaîne glycanique du peptidoglycane ; des acides nocardiques estérifieraient l'arabinogalactane. On aurait ainsi un composé macromoléculaire qui serait un peptidolipopolysaccharide. Ce composé est coupé par saponification douce avec libération d'acides nocardiques, de peptidoglycane et d'un polysaccharide contenant arabinose et galactose. Cependant l'action de l'enzyme AL 1 de Myxobacter, nulle sur la paroi totale, est également négative sur

le peptidoglycane résultant de la saponification ménagée. Une hydrolyse chlorhydrique douce est nécessaire pour sensibiliser la paroi à l'enzyme de *Myxobacter*. Ce résultat est en accord avec l'existence de deux types de liaisons : esters phosphoriques, liaisons osidiques entre le polyoside et le peptidoglycane ; les premières sont coupées par saponification et les secondes par hydrolyse acide. L'attaque par *Myxobacter* ne peut avoir lieu que lorsque le peptidoglycane est débarrassé de toute fraction polysaccharidique.

Les acides nocardiques sont, au moins partiellement, liés au polyoside sous forme d'esters. L'isolement par Lanéele et Asselineau (84) de nocardates d'arabinose à partir des lipides liés de *N. brasiliensis* indique l'existence de telles liaisons.

Les mêmes constituants ont été retrouvés dans les parois et dans les cires D des mycobactéries extraites au chloroforme, ce qui a conduit E. Lederer à supposer que les cires D sont des oligomères de la paroi non utilisés pour la polymérisation ou des produits d'autolyse de la paroi. Les cires D représentent une proportion importante des lipides mycobactériens, 7 à 8 % du poids de bacilles secs pour les souches humaines de *M. tuberculosis* (178) alors qu'elles sont beaucoup moins importantes chez les *Nocardia* : 1 % pour *N. asteroides* (59) et < 1 % pour d'autres espèces de *Nocardia*. Cette différence entre mycobactéries et *Nocardia* pourrait être due à une activité autolytique plus faible chez ces derniers en raison, par exemple, d'une attaque plus difficile par les autolysines de la paroi des *Nocardia*.

La présence d'une grande quantité de lipides libres dans les parois des *Nocardia* pourrait fournir une explication à cette résistance à l'autolyse. Il est en effet remarquable de constater qu'à côté des acides nocardiques liés au polyoside, des quantités importantes d'acides nocardiques libres, des acides en C₁₆ et C₁₈ et des triglycérides sont présents dans les parois. Il est difficile de préciser la localisation de ces lipides : ils peuvent constituer la couche la plus externe de la paroi ou bien être situés entre le peptidoglycane et la membrane cytoplasmique ou encore occuper des espaces vides éventuels dans la zone du peptidoglycane, en tous cas l'un des rôles de ces lipides libres pourrait être de protéger la couche rigide formée par le peptidoglycane et le nocardate de polyoside supprimant ainsi les possibilités d'action des autolysines.

L'évolution de la composition lipidique des *Nocardia* est un autre phénomène qui a vraisemblablement une relation avec cette position des lipides pariétaux. Nous avons constaté qu'au cours de la phase stationnaire le pourcentage d'acides nocardiques augmente au détriment des acides habituels en C₁₆ ou C₁₈. Il est certain qu'au cours de cette période correspondant à un arrêt ou à une très faible activité anabolique, la cellule est beaucoup plus sensible aux processus d'autolyse. La biosynthèse des acides nocardiques au cours de cette période pourrait correspondre à un mécanisme d'autodéfense de la cellule vis à vis des enzymes autolytiques.

La présence d'un pigment caroténoïdique dans les parois de N. kirovani est à priori surprenante. La coloration est d'ailleurs restreinte à certaines espèces de *Nocardia*, la plupart étant peu ou n'étant pas colorées. Dans le cas de N. kirovani les cultures jeunes sont faiblement colorées et la pigmentation s'accroît avec la durée de la croissance pour devenir très intense en phase stationnaire. Il est probable que ce pigment fait partie de la couche lipidique pariétale et il faut noter ses propriétés à la fois lipophiles et hydrophiles en raison de la présence simultanée de chaînes hydrocarbonées et des groupements polaires du glucose.

Si le rôle exact qu'il joue dans la vie cellulaire reste assez mystérieux, on peut constater que l'intensité de sa biosynthèse est parallèle à celle des acides nocardiques. Peut-être peut-on voir là encore un processus d'autodéfense qui permettrait à la bactérie de mieux affronter la "vieillesse".

Un dernier point doit être mentionné. Il est probable que la structure peptidolipopolysaccharidique de la paroi des *Nocardia* telle que nous l'avons envisagée n'est qu'une vue partielle de la réalité. Nous avons pu constater en effet que toutes les préparations de parois purifiées renfermaient à côté des acides aminés du peptidoglycane des quantités faibles d'autres aminoacides, en particulier leucine, valine et sérine. Des résultats identiques ont été obtenus avec d'autres espèces de *Nocardia* (176) et la même observation a été faite par Beaman et coll. chez N. corallina, N. asteroides et N. rubrum (179). Il existe donc dans la paroi une fraction polypeptidique ou protéique résistante à l'action des enzymes protéolytiques utilisés pour la purification de la paroi.

La complexité de l'enveloppe bactérienne des *Nocardia* et des mycobactéries par rapport à celle des autres bactéries Gram positives et Gram négatives est un attrait supplémentaire de l'étude structurale du "monde mystérieux" de ces microorganismes.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 . SALTON M.R.J., The Bacterial Cell Wall, Elsevier Ed., New York 1964.
- 2 . ROGERS H.J., PERKINS H.R., Cells Walls and Membranes, Spon's Biochemical Monographs, E and F.N.Spon Ltd, London 1968.
- 3 . GHUYSEN J.M., STROMINGER J.L., TIPPER D.J., Comprehensive Biochemistry 26 A 53, M.Florkin et E.H.Stotz Ed., American Elsevier Pub. Co, New York 1968.
- 4 . WEIDEL W., PELZER H., Adv.Enzymol., 26(1964)193
- 5 . MARTIN H.H., Ann.Rev.Biochem., 35(1966)457
- 6 . GHUYSEN J.M., Bacteriol.Rev., 32(1968)425
- 7 . OSBORN M.J., Ann.Rev.Biochem., 38(1969)501
- 8 . KUSHNER D.J., BAYLEY S.T., BORING J., KATES M., GIBBONS N.E., Can.J.Microbiol., 10(1964)483
- 9 . BROWN A.D., CHO K.Y., J.Gen.Microbiol., 62(1970)267
10. IKAWA M., SNELL E.E., Biochim.Biophys.Acta, 19(1956)576
11. IKAWA M., SNELL E.E., J.Biol.Chem., 235(1960)1376
12. HOARE D.S., WORK E., Biochem.J., 65(1957)441
13. BRICAS E., GHUYSEN J.M., DEZELEE P., Biochemistry 6(1967)2598
14. VAN HEIJENOORT J., ELBAZ L., DEZELEE P., PETIT J.F., BRICAS E., GHUYSEN J.M., Biochemistry 8(1969)207

15. TIPPER D.J., GHUYSEN J.M., STROMINGER J.L., *Biochemistry*, 4(1965)468
16. COYETTE J., Thèse pour le Doctorat en Sciences Biomédicales Expérimentales, 1969, Liège
17. COYETTE J., GHUYSEN J.M., *Biochemistry* 9(1970)2935
18. ADAM A., PETIT J.F., WIETZERBIN-FALSZPAN J., SINAY P., THOMAS D.W., LEDERER E., *FEBS Letters* 4(1969)87
19. AZUMA I., THOMAS D.W., ADAM A., GHUYSEN J.M., BONALY R., PETIT J.F., LEDERER E., *Biochim.Biophys.Acta* 208(1970)444
20. VILKAS E., MASSOT J.C., ZISSMANN E., *FEBS Letters* 7(1970)77
21. MILLER I., PLAPP R., KANDLER O., *Biochem.Biophys.Res. Comm.*, 25(1966)415
22. GUINAND M., GHUYSEN J.M., SCHLEIFER K.H., KANDLER O., *Biochemistry*, 8(1969)200
23. PERKINS H.R., *Biochem.J.*, 102(1967)29C
24. SCHLEIFER K.H., PLAPP R., KANDLER O., *Biochem.Biophys. Res.Comm.*, 26(1967)492
25. SCHLEIFER K.H., PLAPP R., KANDLER O., *Biochem.Biophys. Res.Comm.*, 28(1968)566
26. MUNOZ E., GHUYSEN J.M., LEYH-BOUILLE M., PETIT J.F., HEYMANN H., BRICAS E., LEFRANCIER P., *Biochemistry* 5(1966)3748
27. TIPPER D.J., STROMINGER J.L., GHUYSEN J.M., *Biochemistry* 6(1967)921
28. TIPPER D.J., *Federation Proc.*, 27(1968)294
29. GHUYSEN J.M., BRICAS E., LEYH-BOUILLE M., LACHE M., SHOCKMAN G.D., *Biochemistry* 6(1967)2607
30. KATO K., STROMINGER J.L., KOTANI S., *Biochemistry* 7(1968)2762

31. HUNGERER D., Federation Proc., 27(1968)294
32. WIETZERBIN-FALSZPAN J., DAS B.C., AZUMA I., ADAM A.,
PETIT J.F., LEDERER E., Biochem.Biophys.Res.Comm.,
40(1970)57
33. MIRELMAN D., SHARON N., Biochem.Biophys.Res.Comm.,
24(1966)237
34. MIRELMAN D., SHARON N., J.Biol.Chem., 242(1967)3414
35. WARTH A.D., Ph.D. Dissertation, University of Wisconsin, 1968
36. LEYH-BOUILLE M., BONALY R., GHUYSEN J.M., TINELLI R.,
TIPPER D.J., Biochemistry 9(1970)2944
37. PERKINS H.R., Biochem.J., 110(1968)47P
38. PERKINS H.R., Biochem.J., 102(1967)29C
39. SCHLEIFER K.H., PLAPP R., KANDLER O., Biochim.Biophys.
Acta 154(1968)573
40. LEYH-BOUILLE M., GHUYSEN J.M., TIPPER D.J.,
STROMINGER J.L., Biochemistry 5(1966)3079
41. MUNOZ E., GHUYSEN J.M., LEYH-BOUILLE M., PETIT J.F.,
TINELLI R., Biochemistry 5(1966)3091
42. GHUYSEN J.M., TIPPER D.J., BIRGE C.H., STROMINGER J.L.,
Biochemistry 4(1965)2245
43. CUMMINS C.S., HARRIS H., J.Gen.Microbiol., 18(1958)173
44. CUMMINS C.S., Ann.Inst.Pasteur, 103(1962)385
45. BECKER B., LECHEVALIER M.P., GORDON R.E.,
LECHEVALIER H.A., Appl.Microbiol., 12(1964)421
46. BECKER B., LECHEVALIER M.P., LECHEVALIER H.A.,
Appl.Microbiol., 13(1965)236
47. LECHEVALIER H.A., LECHEVALIER M.P., BECKER B.,
Int.J.System.Bacteriol., 16(1966)151

48. BERGEY'S MANUAL of Determinative Bacteriology, The Williams and Wilkins Co, Baltimore, 1957
49. KOTANI S., KITaura T., HIRANO T., TANAKA A.,
Biken's J. 2(1959)129
50. TAKEYA K., HISATSUNE K., INOUE Y., J.Bacteriol., 85(1963)24
51. KANETSUNA F., Biochim.Biophys.Acta, 158(1968)130
52. AZUMA I., YAMAMURA Y., FUKUSHI K., J.Bacteriol.,
96(1968)1885
53. KANETSUNA F., IMAEDA T., CUNTO G., Biochim.Biophys.Acta
173(1969)341
54. PETIT J.F., ADAM A., WIETZERBIN-FALSZPAN J., LEDERER E.,
GHUYSEN J.M., Biochem.Biophys.Res.Comm.,
35(1969)473
55. AMAR-NACASCH C., VILKAS E., Bull.Soc.Chim.Biol.,
51(1969)613
56. MICHEL G., BORDET C., LEDERER E., C.R.Acad.Sci.,
250(1960)3518
57. BORDET C., Thèse Doctorat Université, Lyon 1967
58. BORDET C., MICHEL G., Bull.Soc.Chim.Biol., 51(1969)527
59. MICHEL G., Thèse de Doctorat, Paris 1958
60. BROWN O.R., CLARK J.B., J.Bacteriol., 92(1966)1844
61. STEES J.L., BROWN O.R., GRIGSBY R.D., Microbios.,
2(1969)199
62. GERBER N.N., Appl.Microbiol., 18(1969)1
63. GERBER N.N., Tetrahedron Letters, 11(1970)809
64. EL-REGISTAN C.I., KIRILLOVA N.F., KRASNILKOV N.A.,
Izv.Akad.Nauk.SSSR Ser.Biol., 30(1965)128
65. HERTZBERG S., LIAAEN-JENSEN S., Acta Chem.Scand.,
21(1967)15

66. VACHERON M.J., ARPIN N., MICHEL G., C.R.Acad.Sci. Ser.C
271(1970)881
67. KUHN R., J.Chem.Soc., (1938)605
68. KARRER P., JUCKER E., Carotenoids, Traduit par Braude E.A.,
Elsevier, New York 1950
69. ISLER O., SCHUDEL P., Carotin und Carotinoide, D.Steinkopff
Verlag, Darmstadt 1963, p.54
70. LIAAEN-JENSEN S., Acta Chem.Scand., 17(1963)489
71. LIAAEN-JENSEN S., Pure Appl.Chem., 14(1967)227
72. JENSEN A., LIAAEN-JENSEN S., Acta Chem.Scand., 13(1959)1863
73. SCHLEGEL H.G., Arch.Mikrobiol., 31(1958)231
74. HERTZBERG S., JENSEN S.L., Acta Chem.Scand., 20(1966)1187
75. KARRER P., LEUMANN N., Helv.Chim.Acta, 34(1951)445
76. LATO M., BRUNELLI B., CIUFFINI G., MEZZETTI T.,
J.Chromatog. 39(1969)407
77. LIAAEN-JENSEN S., Acta Chem.Scand., 19(1965)1166
78. KLEINIG H., REICHENBACH H., ACHENBACH H.,
Arch.Mikrobiol., 74(1970)223
79. EXTERKATE F.A., VEERKAMP J.H., Biochim.Biophys.Acta,
176(1969)65
80. BORDET C., MICHEL G., Biochim.Biophys.Acta, 70(1963)613
81. MAURICE M.T., Thèse Doctorat de Spécialité (sous presse)
82. LANEELLE M.A., ASSELINEAU J., CASTELNUOVO G.,
Ann.Inst.Pasteur 108(1965)69
83. BORDET C., ETEMADI A.H., MICHEL G., LEDERER E.,
Bull.Soc.Chim., (1965)234

84. LANEELLE M.A., ASSELINEAU J., FEBS Letters 7(1970)64
85. IONEDA T., LEDERER E., ROZANIS J., Chem.Phys.Lipids, 4(1970)375
86. ETEMADI A.H., MARKOVITS J., PINTE F., C.R.Acad.Sci. Ser.D, 263(1966)835
87. MAURICE M.T., VACHERON M.J., MICHEL G., Chem.Phys.Lipids, sous presse
88. ETEMADI A.H., MIQUEL A.M., LEDERER E., BARBER M., Bull.Soc.Chim., (1964)3274
89. MICHEL G., LEDERER E., Bull.Soc.Chim., (1962)651
90. BORDET C., MICHEL G., C.R.Acad.Sci.Ser.C, 262(1966)1294
91. BORDET C., MICHEL G., C.R.Acad.Sci.Ser.C, 262(1966)1810
92. LANEELLE M.A., C.R.Acad.Sci.Ser.C, 263(1966)560
93. CHAMOISEAU G., ASSELINEAU J., C.R.Acad.Sci.Ser.D, 270(1970)2603
94. OKAZAKI H., SUGINO H., KANZAKI T., FUKUDA H., Agr.Biol.Chem., 33(1969)764
95. LANEELLE M.A., ASSELINEAU J., CASTELNUOVO G., Ann.Inst.Pasteur 114(1968)305
96. GORDON H.T., THORNBURG W., WERUM L.N., Ann.Chem., 28(1956)849
97. RYHAGE R., STENHAGEN E., J.Lipid Res., 1(1960)361
98. BARBER M., MERREN T.O., KELLY W., Tetrahedron Letters, (1963)1063
99. LAUER W.M., AASEN A.J., GRAFF G., HOLMAN R.T., Lipids, 5(1970)861
100. AASEN A.J., LAUER W.M., HOLMAN R.T., Lipids, 5(1970)869
101. MAC LAFFERTY F.W., Ann.Chem., 31(1959)82

102. CRAWHALL J.C., ELLIOTT D.F., *Biochem.J.*, 61(1955)264
103. DOWNING D.T., *J.Lipid Res.*, 5(1964)210
104. RAY N.H., *J.Appl.Chem.*, 4(1954)21
105. SONNEVELD W., BEGEMANN P.H., VAN VEERS G.J., KEUNING R., SCHOGT J.C.M., *J.Lipid Res.*, 3(1962)351
106. BORDET C., MICHEL G., *C.R.Acad.Sci.*, 256(1963)3482
107. ASSELINEAU C., MONTROZIER H., PROME J.C., *Europ.J. Biochem.*, 10(1969)580
108. BORDET C., VACHERON M.J., MICHEL G., *FEBS Letters*, 5(1969)253
109. FOLCH J., LEES M., SLOANE-STANLEY G.H., *J.Biol.Chem.*, 226(1957)497
110. LOWRY O.H., ROBERTS N.S., LEINER K.Y., WU M.L., FARR A.L., *J.Biol.Chem.*, 207(1954)1
111. SAUTON B., *C.R.Acad.Sci.*, 155(1912)860
112. DIJKSTRA G., *Nature*, 192(1961)965
113. MES J., KAMM L., *J.Chromatogr.*, 43(1969)480
114. ARPIN N., Thèse Doctorat-ès-Sciences Naturelles, *Bull.Soc.Lin. Lyon*, suppl. Janvier 1969
115. SCHLENK H., GELLERMAN J.L., *Anal.Chem.*, 32(1960)1412
116. GUINAND M., VACHERON M.J., MICHEL G., *FEBS Letters*, 6(1970)37
117. TAKEYA K., HISATSUNE K., *J.Bacteriol.*, 85(1963)16
118. SALTON M.R.J., *Biochim.Biophys. Acta*, 10(1953)512
119. MORI Y., KATO K., MATSUBARA T., KOTANI S., *Biken's J.*, 3(1960)139

120. GHUYSEN J.M., TIPPER D.J., STROMINGER J.L., Methods.
in Enzymology, Academic Press New York, vol.VIII
1966 p.685
121. RHULAND L.E., WORK E., DENNAM R.F., HOARE D.S.,
J.Am.Chem.Soc., 77(1955)4844
122. JUSIC D., ROY C., SCHÖCHER A.J., WATSON R.W.,
Can.J.Biochem.Physiol., 41(1963)817
123. ISHII S.I., WITKOP B., J.Am.Chem.Soc., 85(1963)1832
124. BENDER A.E., KREBS H.A., Biochem.J., 46(1950)210
125. GALE E.F., Methods of Enzymatic Analysis, Verlag Chemie,
Academic Press, New York et London 1965 p. 373
126. GHUYSEN J.M., DIERICKX L., COYETTE J., LEYH-BOUILLE M.,
GUINAND M., CAMPBELL J.N., Biochemistry 8(1969)213
127. ENSIGN J.C., WOLFE R.S., J.Bacteriol., 90(1965)395
128. ENSIGN J.C., WOLFE R.S., J.Bacteriol., 91(1966)524
129. PARK J.T., JOHNSON M.J., J.Biol.Chem., 181(1949)149
130. DUBOS M., GILLES M., HAMILTON K.A., REBERS P.A.,
SMITH F., Anal.Chem., 28(1956)350
131. GHUYSEN J.M., BRICAS E., LACHE M., LEYH-BOUILLE M.,
Biochemistry 7(1968)1450
132. TIPPER D.J., STROMINGER J.L., ENSIGN J.C., Biochemistry
6(1967)906
133. SHARON N., SEIFTER S., J.Biol.Chem., 239(1964)PC2398
134. SHARON N., OSAWA T., FLOWERS H.M., JEANLOZ R.W.,
J.Biol.Chem., 241(1966)223
135. HAKOMORI S.I., J.Biochem., 55(1964)205
136. COREY E.Y., CHAYKOVSKY M., J.Amer.Chem.Soc., 84(1962)866
137. KOCHETKOV N.K., CHIZHOV O.S., Advances in Carbohydrate
Chem., 21(1966)99

138. SINAY P., Carbohydr.Res., 16(1971)113
139. FINDLAY J., LEVY G.A., Biochem.J., 77(1960)170
140. SANDERSON A.R., STROMINGER J.L., NATHENSON S.G.,
J.Biol.Chem., 237(1962)3603
141. TIPPER D.J., Biochemistry 7(1968)1441
142. AMINOFF D., MORGAN W.T.J., WATKINS W.M., Biochem.J.,
51(1952)379
143. REISSIG J.L., STROMINGER J.L., LELOIR L.F., J.Biol.Chem.,
217(1955)99
144. PETIT J.F., ADAM A., WIETZEBIN-FALSZPAN J.,
FEBS Letters 6(1970)55
145. STROMINGER J.L., ITO E., THRENN R.H., J.Amer.Chem.Soc.,
82(1960)998
146. STROMINGER J.L., Biochem.Biophys.Acta, 30(1958)645
147. GUNETILEKE K.G., ANWAR R.A., J.Biol.Chem., 213(1968)5770
148. TAKAYAMA K., DAVID H.L., WANG L., GOLDMAN D.S.,
Biochem.Biophys.Res.Comm., 39(1970)7
149. SHOOP H.J., SCHAUER R., FAILLARD M., Z.Physiol.Chem.,
350(1969)155
150. PELZER H., Z.Naturforsch., 18b(1963)950
151. KAZVO I., STROMINGER J.L., J.Biol.Chem., 243(1968)3193
152. DEZELEE P., BRICAS E., Biochemistry 9(1970)823
153. MIRELMAN D., SHARON N., J.Biol.Chem., 243(1968)2279
154. HUGHES R.C., Biochem.J., 121(1971)791
155. MOORE S., STEIN W.H., J.Biol.Chem., 211(1954)893 et 907
156. GRAY W.R., SMITH J.F., Anal.Chem., 33(1970)36

157. PETIT J.F., MUNOZ E., GHUYSEN J.M., *Biochemistry*, 5(1966)2764
158. LEDERER E., DAS B.C., *Peptides* 1967 p. 131
159. VAN HEIJENOORT J., BRICAS E., DAS B.C., LEDERER E., WOLSTENHOLME W.A., *Tetrahedron* 23(1967)3403
160. SHEMYAKIN M.M., OVCHINNIKOV Yu.A., KIRYUSHKIN A.A., VINOGRADOVA E.I., MIROSHNIKOV A.I., ALAKHOV Yu.B., LIPKIN V.M., SHVETSOV Yu.B., WULFSON N.S., ROSINOV B.V., BOCHKAREV V.N., BURIKOV V.M., *Nature* 211(1966)361
161. ALDERTON G., *J.Amer.Chem.Soc.*, 75(1953)2391
162. RAO K.R., SOBER G.A., *J.Amer.Chem.Soc.*, 76(1954)1328
163. DIRINGER H., JUSIC D.Z., *Z.Naturforsch.*, 21b(1966)603
164. JUSIC D., ROY C., SCHOCHER A.J., WATSON R.W., *Can.J.Chem.*, 41(1963)2715
165. GHUYSEN J.M., LEYH-BOUILLE M., BONALY R., NIETO M., PERKINS H.R., SCHLEIFER K.H., KANDLER O., *Biochemistry* 9(1970)2955
166. LEYH-BOUILLE M., GHUYSEN J.M., BONALY R., NIETO M., PERKINS H.R., SCHLEIFER K.H., KANDLER O., *Biochemistry* 9(1970)2961
167. STROMINGER J.L., PARK J.T., THOMPSON R.E., *J.Biol.Chem.*, 234(1959)3263
168. TIPPER D.J., STROMINGER J.L., *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 22(1966)48
169. DIXON J.S., LIPKIN D., *Anal.Chem.*, 26(1954)1092
170. SUZUKI S., STROMINGER J.L., *J.Biol.Chem.*, 235(1960)2768
171. VILKAS E., LEDERER E., *Tetrahedron Letters*, 26(1968)3089
172. THOMAS D.W., *FEBS Letters*, 5(1969)53

173. LOWRY O.H., ROBERTS N.R., LEINER K.Y., WU M.L.,
FARR A.L., J.Biol.Chem., 207(1954)1
174. RUSSEL J., J.Chromatogr., 4(1960)251
175. ZENTNER H., Chem.Ind., 1968 p.1836
176. KARAHJOLI M.,^{''} Résultats inédits.
177. LEDERER E., Pure and Applied Chem. (sous presse)
178. ASSELINEAU J., Les lipides bactériens, Hermann, Paris 1962,
p. 235
179. BEAMAN B.L., KIM K.S., BARKSDALE NYU L., The 71st
Annual Meeting, Minneapolis, 1971 G49

TABLE DES MATIERES

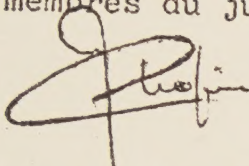
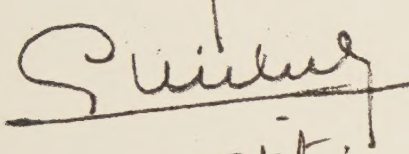
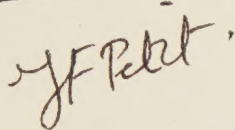
	Page
Introduction	1
Première partie - Etude des lipides	11
Etude du caroténoïde	13
Etude des acides, des alcools et des cétones	22
I. Etude des acides	22
A. Acides gras non hydroxylés	22
B. Acides nocardiques	23
II. Etude des nocardols	29
III. Etude des nocardones	32
Discussion	34
Etude des triglycérides	37
I. Triglycéride A	37
II. Triglycéride B	39
Evolution de la composition lipidique au cours de la croissance	46
Partie expérimentale	50
I. Méthodes générales	50
A. Cultures et extractions	50
B. Séparations chromatographiques	50
C. Spectrométrie de masse	51
D. Spectrométrie dans l'infra-rouge et l'ultra-violet et spectrométrie de R.M.N.	52
II. Techniques appliquées à l'étude des caroténoïdes	52
A. Préparation et séparations chromatographiques	52
B. Déterminations spectrophotométriques	53
C. Acétylation	54
D. Saponification	54
E. Hydrolyse par le chloroforme chlorhydrique	54
F. Oxydation par le parachloranile	55
III. Techniques appliquées à l'étude des lipides	55
A. Chromatographies sur colonne	55
B. Préparation des acides	57
C. Préparation des alcools et des cétones	58
D. Préparation des triglycérides	58

E. Réduction des esters à haut poids moléculaire en hydrocarbures	58
F. Oxydations chromiques	59
IV. Techniques appliquées aux cultures radioactives	59
A. Obtention des bactéries	59
B. Fractionnement des lipides	59
C. Mesure de la radioactivité	60
Deuxième partie - Etude des constituants des parois	61
Préparation des parois	63
Etude des lipides des parois	64
I. Etude des lipides libres	64
II. Etude des composés lipidiques libérés par le traitement alcalin	65
Etude du peptidoglycane	67
I. Composition du peptidoglycane	67
A. Dosage des constituants	67
B. Configuration optique des acides aminés	69
II. Dégradation du peptidoglycane	71
A. Action du lysozyme	71
- hydrolyse enzymatique du disaccharide peptide monomère	74
- hydrolyse enzymatique du bis-disaccharide peptide dimère	76
B. Action de l'enzyme AL 1 de Myxobacter	76
- obtention du disaccharide à partir de la fraction polysaccharidique	80
III. Etude du disaccharide	82
Etude du spectre de masse	82
Hydrolyse enzymatique	86
Réaction de Morgan-Elson	86
Oxydations periodiques	88
Hydrolyses alcalines	90
Conclusions	91
IV. Etude des peptides	
A. Peptides monomères	92
a - étude du tétrapeptide	93
b - étude du tripeptide	104
c - étude des tétrapeptides et tripeptides monoamidés	106
d - étude du pic I	106

B. Peptides dimères	108
- coupure enzymatique des deux peptides dimères	111
C. Peptides trimères	113
D. Etude du disaccharide tétrapeptide par spectrométrie de masse	114
Partie expérimentale	117
I. Préparation des parois	117
II. Techniques appliquées à l'étude des glucides	118
A. Dosage des sucres	118
1. dosage des groupements réducteurs	118
2. réaction de Morgan-Elson	118
3. dosage des hexoses	119
B. Réduction du disaccharide	120
C. Hydrolyses alcalines	120
D. Oxydations periodiques	120
E. Méthylation	121
III. Techniques appliquées aux acides aminés	122
A. Dosage des acides aminés totaux	122
B. Dosage des groupements NH_2 terminaux	122
C. Dosage des groupements COOH terminaux	123
D. Dosage des acides aminés après hydrolyse alcaline	124
E. Dégradation des peptides selon la réaction d'Edman	124
IV. Techniques diverses	125
A. Dosage du phosphore	125
B. Préparation du mono-DNP- <u>meso</u> DAP	125
C. Fractionnement sur colonne	126
D. Chromatographies et électrophorèses	127
Résumé et conclusions	129
Bibliographie	135

Vu.

Les membres du jury :

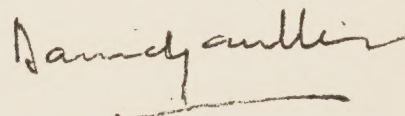
MM. CHOPIN

G. MICHEL

PETIT

Vu et approuvé.

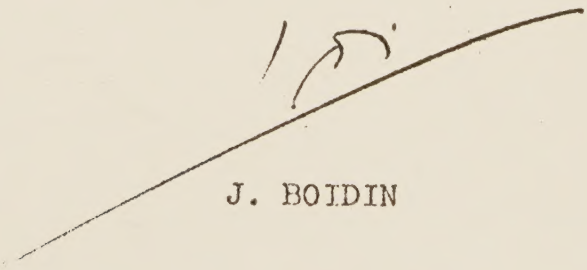
Le Directeur de l'U.E.R.
de CHIMIE BIOCHIMIE



Vu et accordé le permis d'imprimer.

Lyon, le 23 juillet 1971

Le Président de l'Université
Claude Bernard,


J. BOLDIN

